

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 594**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2020** **E 20216079 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3848025**

54 Título: **Composiciones que comprenden aminoácidos para su uso en la prevención y el tratamiento de los efectos secundarios de la quimioterapia**

30 Prioridad:

13.01.2020 IT 202000000442

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2023

73 Titular/es:

PROFESSIONAL DIETETICS S.P.A. (100.0%)
Via Ciro Menotti, 1/A
20129 Milano (MI), IT

72 Inventor/es:

GIORGETTI, PAOLO LUCA MARIA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 954 594 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden aminoácidos para su uso en la prevención y el tratamiento de los efectos secundarios de la quimioterapia

Campo de la invención

- 5 La presente descripción se refiere en general a composiciones que comprenden aminoácidos para su uso en la prevención y el tratamiento de los efectos secundarios de la quimioterapia.

Antecedentes

- 10 El cáncer de mama es la enfermedad neoplásica más prevalente entre las mujeres de todo el mundo. En 2012 se diagnosticaron aproximadamente 1,67 millones de nuevos casos de este tumor. En 2018, se diagnosticaron nuevos casos de cáncer de mama en casi 2,1 millones (11,6%) de mujeres, y alrededor de 627.000 (6,6%) de ellas murieron por este tipo de cáncer. Este pronóstico sugiere que varios tipos de cáncer de mama siguen siendo enfermedades incurables que provocan una elevada tasa de mortalidad femenina.

- 15 Las antraciclinas, tales como la doxorubicina (DOX), son quimioterapéuticos contra el cáncer ampliamente utilizados y de gran éxito. Por desgracia, la administración de DOX provoca efectos secundarios dependientes de la dosis en tejidos no cancerosos, incluido el desarrollo de cardiomiopatía, además de disnea, intolerancia al ejercicio, hepatotoxicidad y nefropatía. Además de las antraciclinas, las terapias más recientes -incluidas las dirigidas contra el factor de crecimiento epidérmico humano (HER) 2 (inhibidores HER2/ErbB2), varios inhibidores de la tirosina cinasa, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular e inhibidores de puntos de control inmunitarios- han demostrado profundas toxicidades cardiovasculares. En pacientes con cáncer de mama HER2-positivo, el tratamiento con trastuzumab también se ha relacionado con la cardiomiopatía, caracterizada por la pérdida de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo tras el tratamiento. Los pacientes con cáncer que desarrollan una cardiomiopatía relacionada con el tratamiento oncológico tienen una supervivencia significativamente peor que los que no presentan cardiotoxicidad. Estas toxicidades representan un factor limitante en la terapia de varias neoplasias que de otro modo serían tratables, y una población envejecida con una reserva cardíaca deteriorada puede ser aún más susceptible a estos efectos. Por lo tanto, el riesgo de cardiotoxicidad es uno de los mayores factores limitantes del uso clínico de estos fármacos, lo que da lugar a eventos cardiovasculares tanto agudos como crónicos. Por ejemplo, la toxicidad cardíaca aguda del DOX puede desarrollarse entre minutos y días después de la administración y normalmente se caracteriza por hipotensión, arritmia y, lo que es más importante, fallo ventricular izquierdo. Aunque los mecanismos moleculares de estos efectos secundarios no se conocen del todo, también porque el DOX afecta a muchos procesos intracelulares diferentes, cada vez hay más pruebas que sugieren que el principal mediador del daño cardíaco por DOX es el estrés oxidativo, con un aumento de la peroxidación lipídica dependiente de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y una reducción de los niveles de antioxidantes y grupos sulfhidrilo. El aumento del estrés oxidativo va seguido del desarrollo de cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca. La disfunción mitocondrial puede estar implicada en los efectos secundarios inducidos por el DOX y, en general, por otros agentes quimioterapéuticos, dado que la elevada producción de ROS provoca un deterioro mitocondrial, con reducción de la síntesis de ATP, y apoptosis de las células cardíacas.

- 40 El documento WO 2012/147901 desvela una composición que comprende al menos un aminoácido elegido entre isoleucina, leucina y valina adecuado para tratar efectos secundarios de fármacos procedentes de agentes quimioterapéuticos. El documento WO 2019/021135 desvela una composición que comprende aminoácidos para promover la biogénesis mitocondrial y mejorar la función mitocondrial en un individuo.

No obstante, la cardiomiopatía y la insuficiencia cardíaca inducidas por agentes quimioterapéuticos son diferentes desde el punto de vista anatómico-patológico y fisiopatológico en comparación con la insuficiencia cardíaca inducida por causas cardiovasculares. Por este motivo, la cardiomiopatía y la insuficiencia cardíaca inducidas por la quimioterapia suelen ser refractarias al tratamiento convencional.

- 45 Además, otras cuestiones críticas asociadas a la identificación de tratamientos eficaces de la cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia radican en la evidencia de que los enfoques potencialmente adecuados para el tratamiento de la cardiomiopatía o la insuficiencia cardíaca pueden no ser adecuados para el grupo específico de pacientes, es decir, los pacientes afectados por el cáncer. Las células cancerosas tienen perfiles metabólicos diferentes a los de las células de individuos sanos y están surgiendo pruebas contrastadas sobre el papel de la actividad mitocondrial en la proliferación de las células cancerosas. Los enfoques terapéuticos capaces de restaurar la funcionalidad mitocondrial pueden conducir a un aumento de la proliferación de las células cancerosas y, de este modo, a una reducción del efecto antineoplásico ejercido por los agentes quimioterapéuticos.

Sumario de la invención

- 55 La presente descripción tiene por objeto proporcionar nuevas composiciones a base de aminoácidos particularmente eficaces para contrarrestar la cardiotoxicidad inducida por agentes quimioterapéuticos en un individuo afectado por cáncer y sometido a quimioterapia.

De acuerdo con la presente descripción, el objeto anterior se alcanza gracias a la técnica específicamente recordada en las reivindicaciones siguientes, que se entiende forman parte integrante de la presente divulgación.

Una realización de la presente descripción proporciona una composición para su uso en la prevención y/o tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por al menos un agente quimioterapéutico en un individuo sometido a quimioterapia, la composición que comprende un agente activo, dicho agente activo que contiene los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina y ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico.

El al menos un agente quimioterapéutico puede seleccionarse en el grupo que consiste en antraciclinas, inhibidores de HER2/ErbB2, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular, inhibidores de punto de control inmunitario. Las antraciclinas se seleccionan preferentemente en el grupo que consiste en doxorubicina, epirrubicina, daunorrubicina, idarrubicina, pixantrona, sabarrubicina, valrubicina, derivados de las mismas.

En una o más realizaciones, el agente activo de la composición contiene además uno o más aminoácidos seleccionados en el grupo que consiste en histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, cisteína y tirosina.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá a continuación, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- La figura 1 es un esquema que muestra el tratamiento de células cardíacas HL-1.
- La figura 2 es un esquema que muestra el tratamiento *in vivo* en ratones.
- La figura 3 muestra que composiciones específicas de aminoácidos previenen la disfunción mitocondrial en cardiomiocitos HL-1 expuestos agudamente a DOX. (A) Expresión de marcadores de la biogénesis mitocondrial: se analizaron los niveles de ARNm del receptor activado por proliferador de peroxisomas- γ coactivador 1 α (PGC1- α), el factor respiratorio nuclear-1 (NRF1), el factor de transcripción A (Tfam), el citocromo c (citocromo c) y la subunidad IV de la citocromo c oxidasa (COX IV) por medio de RT-PCR cuantitativa. Los valores de expresión relativa para las células no tratadas (CTRL) se tomaron como 1,0 (n = 5 experimentos). (B) Los niveles de proteína COX IV y cyt c se detectaron por medio de análisis de inmunotransferencia. Los valores relativos se determinaron por medio de análisis densitométrico en relación con los niveles de GAPDH; los valores de las células no tratadas (CTRL) se tomaron como 1,0 (n = 5 experimentos). (C) Actividad del citrato sintasa. Los valores se normalizaron con respecto al contenido de proteínas (n = 3 experimentos). *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001 frente a células no tratadas; †p < 0,01 frente a células tratadas con DOX; §p < 0,01 frente a células tratadas con BCAAem. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.
- La Figura 4 muestra que los intermediarios del TCA no evitan la reducción de los genes de la biogénesis mitocondrial inducida por el DOX en los cardiomiocitos HL-1. (A-C) Receptor activado por proliferador de peroxisomas- γ coactivador 1 α (PGC-1 α) (A), factor respiratorio nuclear-1 (NRF1) (B), y factor de transcripción A (Tfam) (C). Los niveles de ARNm se analizaron por medio de RT-PCR cuantitativa. Los valores de expresión relativa para las células no tratadas (CTRL) se tomaron como 1,0 (n=3 experimentos). C, ácido cítrico; S, ácido succínico, M, ácido málico. *p < 0,05 frente a células no tratadas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.
- La Figura 5 muestra que la suplementación con $\alpha 5$ previene el estrés oxidativo inducido por DOX en cardiomiocitos HL-1. (A) Liberación mitocondrial de H₂O₂, (B) relación aconitasa basal/aconitasa total y (C) actividad superóxido dismutasa (SOD) en células HL-1 (n=3 experimentos). (D) Los niveles de ARNm de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) y la glutatión peroxidasa 1 (GPX1) se analizaron por medio de RT-PCR cuantitativa. Los valores de expresión relativa para las células no tratadas (CTRL) se tomaron como 1,0 (n=5 experimentos). (E) Daño oxidativo total del ADN medido como producción de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en células no tratadas (CTRL) y células tratadas con DOX (n=3 experimentos). *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001 frente a células no tratadas; †p < 0,01 frente a células tratadas con DOX. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.
- La figura 6 muestra que la composición $\alpha 5$ previene la muerte inducida por DOX de las células HL-1. La citotoxicidad de los cardiomiocitos HL-1 se evaluó con el ensayo MTT. Las células se trataron con 1 % $\alpha 5$ durante 48 h y 1 μ M DOX durante 16 h. *p < 0,05 frente a células no tratadas; †p < 0,05 frente a células tratadas con DOX. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.
- La figura 7 muestra que la composición $\alpha 5$ previene la disfunción mitocondrial en el ventrículo izquierdo de ratones tratados con DOX. (A y F) Expresión de marcadores de biogénesis mitocondrial. (A) Los niveles de ARNm de PGC1- α , NRF1, Tfam, cyt c, COX IV y (F) SOD1, superóxido dismutasa 2 (SOD2), catalasa (Cat) y GPX1 se analizaron por medio de RT-PCR cuantitativa. Los valores de expresión relativa para los ratones tratados con vehículo (Veh) se tomaron como 1,0 (n = 5 experimentos). (B) Se analizó la cantidad de ADN mitocondrial (ADNmt) por medio de RT-PCR cuantitativa. Las unidades relativas se expresaron en comparación con las de los ratones tratados con Veh, que se tomaron como 1,0 (n = 5 experimentos). (C) Los niveles de proteína COX IV y cyt c se determinaron por medio de análisis de inmunotransferencia. Los valores relativos se determinaron por medio de análisis densitométrico en relación con los niveles de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); los valores de los ratones tratados con Veh se tomaron como 1,0 (n = 5

experimentos). (D) Actividad de la citrato sintasa. Los valores se normalizaron con respecto al contenido de proteínas (n = 3 experimentos). (E) Tasa de consumo basal de oxígeno. Se aislaron mitocondrias del ventrículo izquierdo de ratones tratados o no con DOX y $\alpha 5$. Las tasas de consumo de oxígeno se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína mitocondrial (n = 3 experimentos). *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001 frente a ratones tratados con Veh; †p < 0,05 y ††p < 0,01 frente a ratones tratados con DOX. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.

- La figura 8 muestra que diferentes vías de señalización están implicadas en los efectos protectores de la suplementación con $\alpha 5$ en ratones tratados con DOX. (A, E y F) Expresión génica. (A) Se analizaron los niveles de ARNm de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), (E) Sestrin2 y (F) Krüppel-like factor 15 (KLF15) por medio de RT-PCR cuantitativa. Los valores de expresión relativos de los ratones tratados con vehículo (Veh) se tomaron como 1,0 (n = 5 experimentos). (B, C, D y G) Niveles de proteínas. (B) Los niveles de proteína fosfo-eNOS, (C) fosfo-S6, (D) fosfo-mTOR y (G) fosfo-BCKDH se detectaron por medio de análisis de inmunotransferencia. Los valores relativos se analizaron densitométricamente y se presentaron como proporciones de los niveles totales de eNOS, S6, mTOR y BCKDH, respectivamente. Los valores de los ratones tratados con Veh se tomaron como 1,0 (n = 5 experimentos). *p < 0,05 y **p < 0,01 frente a ratones tratados con Veh; †p < 0,05 frente a ratones tratados con DOX. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.
- La figura 9 muestra que diferentes vías de señalización están implicadas en los efectos protectores de la suplementación con $\alpha 5$ en cardiomiocitos HL-1 tratados con DOX. (A, D y F) Expresión génica. (A) Los niveles de ARNm de eNOS, (D) Sestrin2, (F) KLF15 se analizaron por medio de RT-PCR cuantitativa. Los valores de expresión relativa para las células no tratadas (CTRL) se tomaron como 1,0 (n=5 experimentos). (B, C, E-H) Niveles de proteínas. (B) Los niveles de fosfo-eNOS, (C) fosfo-S6, (E) fosfo-Akt, (F) KLF15, (G) PGC-1 α y COXIV, y (H) fosfo-S6 y fosfo-BCKDH se detectaron por medio de análisis de inmunotransferencia. Los valores relativos se analizaron por medio de densitometría y se expresaron como proporciones respecto a los niveles totales de eNOS, S6, Akt y BCKDH, respectivamente; KLF15, PGC-1 α y COXIV se normalizaron respecto a GAPDH. Los valores para las células HL-1 no tratadas se tomaron como 1,0 (n=5 experimentos). (G) Los niveles de proteína PGC1- α y COX IV se midieron por medio de análisis de inmunotransferencia en células HL-1 transfectadas con ARNsi KLF15 específico o ARNsi no selectivo, y tratadas con DOX o $\alpha 5$ solo o en combinación. Los valores para las células HL-1 no tratadas se tomaron como 1,0 (n = 5 experimentos). (H) La fosforilación de S6 y BCKDH se midió por medio de análisis de inmunotransferencia en células HL-1 como en (H). *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001 frente a células no tratadas; †p < 0,05 frente a células tratadas con DOX. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.
- La figura 10 muestra el silenciamiento específico de Klf15, eNOS y Raptor en cardiomiocitos HL-1. (A-C) Los niveles de ARNm de Klf15, eNOS y Raptor se analizaron por medio de RT-PCR cuantitativa y los niveles de proteína de KLF15, eNOS y Raptor se detectaron por medio de análisis de inmunotransferencia. Los valores de expresión relativa para las células no tratadas (CTRL) se tomaron como 1,0 (n = 5 experimentos). *p < 0,05 frente a células no tratadas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.
- La figura 11 muestra el silenciamiento específico de eNOS y Raptor en cardiomiocitos HL-1. (A) Los niveles de proteínas PGC1- α y COX IV se midieron por medio de análisis de inmunotransferencia en células HL-1 transfectadas con ARNsi eNOS específico o ARNsi no selectivo, y tratadas con DOX o $\alpha 5$ solo o en combinación. (B) Los niveles de proteínas PGC1- α y COX IV se midieron por medio de análisis de inmunotransferencia en células HL-1 transfectadas con ARNsi Raptor específico o ARNsi no selectivo, y tratadas con DOX o $\alpha 5$ solo o en combinación. Los valores para las células no tratadas (CTRL) se tomaron como 1,0 (n = 3 experimentos). *p < 0,05, **p < 0,01 y ***p < 0,001 frente a células no tratadas; †p < 0,05 frente a células tratadas con DOX. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.
- La figura 12 muestra un modelo propuesto de las acciones protectoras de $\alpha 5$ sobre el daño mitocondrial inducido por doxorubicina (DOX) en cardiomiocitos. Los símbolos más (+) y menos (-) indican estimulación o inhibición inducida por DOX y, potencialmente, los sitios diana $\alpha 5$. El DOX reduce la biogénesis y la función mitocondrial 1) uniéndose a la topoisomerasa II β (TOP2B), que forma complejos con los promotores de Ppargc1a y Ppargc1b y bloquea la transcripción de genes mitocondriales, incluidos los genes de defensa frente a ROS, 2) reduciendo la expresión de eNOS y la actividad de mTORC1 que son importantes reguladores de la fisiología mitocondrial, 3) limitando la expresión del gen KLF15 y presumiblemente la oxidación de los BCAA, con acumulación de α -cetoácidos y BCAA, que son tóxicos a altos niveles, más allá de la reducción de los intermediarios del ciclo del TCA y de la producción de energía mitocondrial. La acumulación mitocondrial de DOX va acompañada de un aumento de ROS.
- La figura 13 se refiere a la proliferación de células de cáncer de mama MCF7. El efecto antiproliferativo del DOX permaneció inalterado en las células MCF7 en presencia de la mezcla de aminoácidos. (A) Ensayo de fosfatasa ácida: las células (5.000-20.000/pocillo en placas de 96 pocillos) se trataron con 1% $\alpha 5$ durante 48 h y 1 μ M DOX durante 16 h. (B) Ensayo de proliferación: las células (50.000/pocillo en placas de 12 pocillos) se trataron como en (A) y se utilizó el ensayo de exclusión con azul Trypan. n = 3 experimentos. *p < 0,05 y **p < 0,01 frente a células no tratadas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ DE.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

En la siguiente descripción, se dan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones. Las realizaciones pueden llevarse a la práctica sin uno o más de los detalles específicos, o con

otros procedimientos, componentes, materiales, etc. En otros casos, no se muestran ni se describen en detalle estructuras, materiales u operaciones bien conocidos para evitar oscurecer aspectos de las realizaciones.

La referencia a lo largo de esta especificación a "una realización" o "una realización" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización. De este modo, las apariciones de las frases "en una realización" o "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones. Los títulos que figuran en el presente documento se utilizan únicamente por comodidad y no interpretan el alcance o significado de las realizaciones.

La presente descripción tiene por objeto proporcionar nuevas composiciones a base de aminoácidos particularmente eficaces para contrarrestar la cardiotoxicidad inducida por agentes quimioterapéuticos en un individuo sometido a quimioterapia. La composición es capaz de prevenir y restaurar la disfunción mitocondrial inducida específicamente por agentes quimioterapéuticos en células cardíacas. La cardiotoxicidad inducida por agentes quimioterapéuticos puede comprender cardiomiopatía o insuficiencia cardíaca.

La presente descripción proporciona una composición para prevenir y/o tratar la cardiotoxicidad inducida por al menos un agente quimioterapéutico en un individuo afectado por cáncer y sometido a quimioterapia, la composición que comprende un agente activo, dicho agente activo que contiene los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina y ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico.

Los agentes quimioterapéuticos, también denominados agentes antineoplásicos, se utilizan para inhibir directa o indirectamente la proliferación de células de crecimiento rápido, ejerciendo un efecto antineoplásico. La composición divulgada en la presente memoria es eficaz para prevenir y/o tratar la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas, inhibidores de HER2/ErbB2, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular, inhibidores de puntos de control inmunitarios. Las antraciclinas pueden seleccionarse en el grupo que consiste en doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, idarrubicina, pixantrona, sabarrubicina, valrubicina, derivados de las mismas.

La divulgación proporciona además preparaciones combinadas que comprenden la composición divulgada en la presente memoria y al menos un agente quimioterapéutico para uso simultáneo, separado y secuencial en la prevención y/o tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por dicho al menos un agente quimioterapéutico en un individuo afectado por cáncer.

Se ha demostrado que la suplementación dietética crónica (3 meses) con una mezcla enriquecida con aminoácidos de cadena ramificada (BCAAem) promovía la biogénesis mitocondrial en el músculo cardíaco y esquelético de ratones de mediana edad. También se ha demostrado que una composición que comprende los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina, valina, en combinación con treonina, lisina y ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico es eficaz para mejorar la función mitocondrial, como se divulga en el documento WO 2019/021135 A1. Sin embargo, también se ha demostrado que los crecientes esfuerzos para prevenir y tratar la cardiotoxicidad inducida específicamente por agentes quimioterapéuticos, que abarcan la administración de fármacos potencialmente eficaces, se han propuesto de forma poco concluyente [1].

El Inventor de la presente solicitud ha descubierto ahora sorprendentemente que la composición divulgada en la presente memoria puede utilizarse ventajosamente en el tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por agentes quimioterapéuticos en individuos sometidos a quimioterapia. En concreto, las pruebas realizadas *in vitro* e *in vivo* muestran que i) las células cardíacas tratadas con doxorubicina, como agente quimioterapéutico, no son refractarias al tratamiento con la composición divulgada en la presente memoria en la restauración de la funcionalidad mitocondrial y ii) que la composición es capaz de contrarrestar la cardiotoxicidad inducida por el agente quimioterapéutico.

Además, como se muestra en las secciones siguientes, la composición puede administrarse con seguridad también al grupo específico de individuos, es decir, individuos sometidos a quimioterapia y, de ese modo, que sufren patologías tumorales. El aspecto sorprendente de estas pruebas se deriva de la consideración de que -como se ha expuesto en la sección anterior- las células cancerosas tienen perfiles metabólicos diferentes de los de las células de individuos sanos y las pruebas contradictorias se centran en el papel de la actividad mitocondrial en la proliferación de las células cancerosas. Por ejemplo, se ha demostrado que la supresión del ADN mitocondrial de las células cancerosas reduce su crecimiento y tumorigenicidad; en base a estas observaciones, un restablecimiento de la funcionalidad mitocondrial podría conducir, por el contrario, a un aumento de la proliferación de las células tumorales y determinar también una reducción del efecto antineoplásico ejercido por los agentes quimioterapéuticos.

La composición divulgada en la presente memoria, por el contrario, es i) eficaz para restaurar la funcionalidad mitocondrial en células cardíacas tratadas con doxorubicina, ii) no favorece la proliferación de células tumorales, iii) no altera los efectos antineoplásicos ejercidos por la doxorubicina, iv) muy sorprendentemente es capaz de potenciar el efecto antiproliferativo de la doxorubicina.

Como se describe a continuación, se probó la composición que comprende aminoácidos esenciales e intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico, denominada composición $\alpha 5$, y se exploró su efecto en cardiomiocitos HL-1 y ratones tratados con DOX. En comparación con una composición que comprende aminoácidos esenciales de cadena ramificada -denominada composición BCAAem- sin ácido tricarboxílico, la suplementación con la composición $\alpha 5$ fue significativamente más eficaz para promover efectos protectores sobre la disfunción mitocondrial inducida por DOX. Los resultados se ampliaron *in vivo* en ratones jóvenes expuestos a un tratamiento agudo con DOX. Los resultados han mostrado las siguientes evidencias: i) la aparición de disfunción mitocondrial tras la administración aguda de DOX, ii) una marcada validez defensiva de la suplementación a corto plazo con la composición $\alpha 5$. Por lo tanto, la composición puede utilizarse en la prevención y/o el tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por agentes quimioterapéuticos, para de este modo prevenir también la cardiomiopatía y/o la insuficiencia cardíaca que pueden derivarse de dicha cardiotoxicidad inducida.

La composición divulgada en la presente memoria comprende un agente activo, dicho agente activo contiene ácido cítrico, ácido succínico y ácido málico en combinación con leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina, y la relación en peso entre la cantidad total de ácido cítrico, ácido succínico y ácido málico y la cantidad total de los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina puede estar comprendida entre 0,05 y 0,3, preferentemente entre 0,1 y 0,25.

En una o más realizaciones, la composición puede consistir en leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina, ácido cítrico, ácido succínico y ácido málico y, opcionalmente, vitamina B1 y/o vitamina B6.

En una o más realizaciones, el agente activo puede comprender además uno o más aminoácidos seleccionados en el grupo que consiste en histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, cisteína, tirosina.

En una o más realizaciones, la composición puede comprender un agente activo consistente en leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina, histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, cisteína y opcionalmente tirosina, así como ácido cítrico, ácido succínico y ácido málico, siendo dichos aminoácidos los únicos aminoácidos contenidos en la composición.

En una o más realizaciones, la composición puede estar libre de cualquier otro agente activo, tal como cualquier agente quimioterapéutico, es decir, cualquier agente que inhiba directa o indirectamente la proliferación de células de crecimiento rápido, ejerciendo un efecto antineoplásico.

En una o más realizaciones, la composición puede consistir en leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina, histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, cisteína, tirosina, ácido cítrico, ácido succínico y ácido málico y, opcionalmente, vitamina B1 y/o vitamina B6.

La composición puede comprender los aminoácidos isoleucina, leucina y valina en una cantidad comprendida entre el 35% y el 65% en peso, preferentemente entre el 42% y el 56% en peso con respecto al peso del agente activo.

La relación en peso entre la leucina y el ácido cítrico está comprendida entre 5 y 1, preferentemente entre 2,50 y 3,50.

En una o más realizaciones, la cantidad en peso o molar de ácido cítrico es superior a la cantidad en peso o molar de cada uno de los ácidos málico y succínico. Preferentemente, la cantidad en peso o molar de ácido cítrico es superior a la cantidad en peso o molar global de ácido málico más ácido succínico. En otra realización, la relación en peso entre el ácido cítrico y la suma del ácido málico y el ácido succínico está comprendida entre 1,0 y 4,0, preferentemente entre 1,5 y 2,5. En una realización preferente, la relación en peso ácido cítrico:ácido málico:ácido succínico está comprendida entre 10:1:1 y 2:1,5:1,5, preferentemente entre 7:1:1 y 1,5:1:1, más preferentemente entre 5:1:1 y 3:1:1. En una realización preferente, la proporción en peso de ácido cítrico:ácido málico:ácido succínico es de 4:1:1.

La relación molar isoleucina:leucina preferente está comprendida en el intervalo 0,2-0,7, preferentemente en el intervalo 0,30-0,60 y/o la relación en peso valina:leucina preferente está comprendida en el intervalo 0,2-0,70, preferentemente en el intervalo 0,30-0,65.

La relación molar treonina:leucina puede estar comprendida en el intervalo de 0,10-0,90, preferentemente en el intervalo de 0,20-0,70 y/o la relación ponderal lisina:leucina está comprendida en el intervalo de 0,20-1,00, preferentemente en el intervalo de 0,40-0,90.

En una realización preferente, la relación entre la cantidad molar total de ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico y la cantidad molar total de metionina, fenilalanina, histidina y triptófano es superior a 1,35.

En una o más realizaciones, la relación en peso entre la suma de ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico y la suma de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina, valina está comprendida entre 0,1 y 0,4, preferentemente entre 0,15 y 0,35.

En otra realización, la cantidad global en peso de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina, valina más treonina y lisina es superior a la cantidad global en peso de los tres ácidos cítrico, ácido málico, ácido succínico. Preferentemente, la cantidad en peso de los ácidos simples (ácido cítrico, ácido succínico o ácido málico) es inferior a la cantidad en peso de cada uno de los aminoácidos simples leucina, isoleucina, valina, treonina y lisina.

- 5 En otra realización, la cantidad molar global de lisina y treonina es superior a la cantidad molar global de los tres ácidos cítrico, ácido succínico y ácido málico. Preferentemente, la relación entre la cantidad molar global de los tres ácidos cítrico, ácido succínico, ácido málico y la cantidad molar global de lisina y treonina está comprendida entre 0,1 y 0,7, preferentemente entre 0,15 y 0,55.

- 10 En una o más realizaciones, la composición divulgada en la presente memoria comprende además vitaminas, preferentemente seleccionadas en el grupo de las vitaminas B, como la vitamina B₁ y/o la vitamina B₆. Además, la composición puede incluir hidratos de carbono y/o sustancias aromatizantes.

- 15 En una o más realizaciones, la composición puede ser una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición también puede comprender excipientes farmacéuticamente aceptables, como por ejemplo proteínas, vitaminas, hidratos de carbono, edulcorantes naturales y artificiales y/o sustancias aromatizantes. En una realización preferente, los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse entre proteínas de suero, maltodextrinas, fructosa, caseinato de calcio, aceite de pescado, ácido cítrico o sales del mismo, sucralosa, ésteres de sacarosa, vitamina D₃, vitaminas del grupo B.

- 20 En una o más realizaciones, el agente activo de la composición puede contener además al menos un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo formado por antraciclinas, inhibidores de HER2/ErbB2, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular, inhibidores de puntos de control inmunitarios. Las antraciclinas pueden seleccionarse en el grupo que consiste en doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, idarrubicina, pixantrona, sabarrubicina, valrubicina, derivados de las mismas.

- 25 Además, en particular al preparar las composiciones de acuerdo con la presente divulgación, y específicamente el agente activo, debe evitarse el aminoácido arginina. Además, otros aminoácidos específicamente excluidos por la composición divulgada en la presente memoria son serina, prolina, alanina. Dichos aminoácidos pueden ser contraproducentes o incluso perjudiciales en algunas concentraciones o proporciones estequiométricas dentro de la composición.

Los aminoácidos descritos en la presente descripción pueden sustituirse por sus respectivos derivados farmacéuticamente aceptables, a saber, sales.

- 30 En una o más realizaciones, las composiciones divulgadas en la presente memoria pueden usarse en la prevención y/o tratamiento de cardiomiopatía y/o insuficiencia cardíaca inducida por agentes quimioterapéuticos en un individuo sometido a quimioterapia.

Para uso oral, las composiciones de acuerdo con la descripción pueden presentarse en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, gel, polvo gelificante, polvo.

- 35 La divulgación también proporciona un procedimiento para prevenir y/o tratar la cardiotoxicidad inducida por agentes quimioterapéuticos en un individuo sometido a quimioterapia, preferentemente previniendo la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, el procedimiento comprende seleccionar una composición que comprende un agente activo, dicho agente activo contiene los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina y los ácidos carboxílicos cítrico, ácido succínico y ácido málico, y administrar la composición al individuo. El agente activo puede comprender además uno o más aminoácidos seleccionados en el grupo que consiste en histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, cisteína, tirosina, como se divulga en el presente documento.

- 40 La composición puede administrarse sola, por lo que el procedimiento consiste en seleccionar la composición y administrar la composición al individuo. En una o más realizaciones, la composición puede administrarse en combinación -simultánea, secuencial o separadamente- con al menos un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede seleccionarse en el grupo que consiste en antraciclinas, inhibidores de HER2/ErbB2, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular, inhibidores del punto de control inmunitario. Las antraciclinas pueden seleccionarse preferentemente en el grupo que consiste en doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, idarrubicina, pixantrona, sabarrubicina, valrubicina, derivados de los mismos.

- 50 Otras especificaciones, en términos de cantidades y proporciones entre los diversos aminoácidos proporcionados por las composiciones están contenidas en las reivindicaciones adjuntas, que forman parte integrante de la enseñanza técnica proporcionada en el presente documento en relación con la invención.

EJEMPLOS

- 55 La Tabla 1 muestra dos composiciones diferentes a base de aminoácidos probadas en células HL-1 como se describe a continuación. Las dos composiciones son la composición "BCAAem", también divulgada en el

documento EP 2 196 203 B1 y la composición "α5" que comprende un agente activo que contiene aminoácidos y ácido cítrico, ácido succínico y ácido málico.

Tabla 1

Composición (% p/p)	BCAAem	α5
L-Leucina	30,01	31,0885
L-Lisina HCl clorhidrato	19,58	16,9030
L-Isoleucina	15,00	10,3628
L-Valina	15,00	10,3628
L-treonina	8,40	7,2540
L-cisteína	3,60	3,1089
L-histidina	3,60	3,1089
L-Fenilalanina	2,40	2,0726
L-metionina	1,20	1,0363
L-Tirosina	0,72	0,6218
L-triptófano	0,48	2,0726
Ácido cítrico	-	8,001
Ácido succínico	-	2,00
Ácido málico	-	2,00
Vitamina B1 (clorhidrato de tiamina)	-	0,004
Vitamina B6 (clorhidrato de piridoxina)	-	0,0038

Las composiciones de la Tabla 1 anterior pueden prepararse primero tamizando todos los componentes con una malla de 0,8. A fin de obtener una premezcla, cada ingrediente (en una cantidad <10% en peso de la cantidad total) se introduce en una bolsa de polietileno junto con una porción de L-lisina HCl hasta obtener aproximadamente el 10% del peso de la composición total. A continuación, la bolsa se agita manualmente durante 5 minutos. A continuación, la premezcla se carga en una mezcladora (Planetaria) junto con el resto de los ingredientes y se mezcla durante un periodo de 15 minutos a 120 rpm para obtener una composición final homogénea.

Procedimientos

Cultivos y tratamientos celulares

Se han seguido las normas de la Declaración de Helsinki. Los cardiomiocitos HL-1 se obtuvieron de W.C. Claycomb (Millipore Cat# SCC065) y sembradas en matraces recubiertos de fibronectina/gelatina, cultivadas hasta una confluencia del 70-80% en medio Claycomb (Sigma-Aldrich) suplementado con 100 μM de norepinefrina (a partir de una solución madre de 10 mM de norepinefrina [Sigma-Aldrich] disuelta en 30 mM de ácido L-ascórbico [Sigma-Aldrich]), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich) [2,3]. La línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano (ATCC®HTB-22™) también disponible en P. Limonta (Ciencias Farmacológicas y Biomoleculares, Universidad de Milán, Milán, Italia) se cultivó en DMEM con pH 7,4, que contenía estreptomycin (100 U/ml), penicilina (200 mg/ml) y gentamicina (50 mg/ml), y se complementó con un 10 % de FBS. Ambos tipos celulares se trataron con BCAAem al 1 % o α5 durante 48 h y 1 μM de DOX durante 16 h (Figura 1). Los porcentajes detallados de composición de las mezclas se muestran en la Tabla 1.

Para el estudio de fosfo-proteínas, las células HL-1 fueron tratadas con 1 % α5 durante 2 h y 1 μM DOX (Doxo-HCl de Sigma-Aldrich D15D15) durante los últimos 60 min. Para los experimentos de knockdown de Klf15, eNOS y Raptor, las células HL-1 se transfectaron con 50-100 nM de siRNA de Klf15, eNOS y Raptor SMARTpool (Dharmacon; Lafayette, CO) o siGENOME nontargeting siRNA mediante el uso del reactivo de transfección Dharmafect 1. El siRNA no targeting se transfectó con el reactivo de transfección siGENOME SMARTpool

(Dharmacon; Lafayette, CO). Tras 24 h de transfección, las células se trataron con $\alpha 5$ al 1% durante 24 h y 1 μM de DOX durante 16 h. La eficacia de la transfección se determinó con siGLO-RISC-free nontargeting siRNA y la captación de siRNA por medio de detección de fluorescencia (absorbancia/emisión 557/570). A continuación, se extrajeron las proteínas para el análisis Western blot.

5 Animales y tratamientos

El protocolo experimental utilizado fue aprobado por el Comité Ético Institucional de la Universidad de Milán (n. 16/09) y cumplía con las Directrices Nacionales de Protección Animal. Cuarenta ratones machos C57BL6/J (de 9 semanas de edad) se alojaron por separado en jaulas limpias de polipropileno y se dividieron en cuatro grupos (Figura 2): 1) el grupo de control (CTRL, $n = 10$ ratones) alimentados con dieta estándar (4,3 kcal % de grasa, 18,8 kcal % de proteína, 76,9 kcal % de hidratos de carbono; Laboratorio Dottori Piccioni) y que recibieron una única inyección i.p. de solución salina (vehículo); 2) el grupo $\alpha 5$ ($n = 10$ ratones) alimentados con dieta estándar y suplementación con $\alpha 5$ (1,5 mg/g de peso corporal/día en agua de bebida) que recibieron una única inyección i.p. de solución salina (vehículo). la composición de $\alpha 5$ se disolvió en agua del grifo, tras calcular el volumen medio diario de bebida 2 semanas antes del inicio del tratamiento y se almacenó a 4°C antes de la administración diaria; 3) el grupo DOX ($n = 10$ ratones) alimentados con dieta estándar y que recibieron i.p. DOX (Doxo-HCl de Sigma-Aldrich) inyectado a 20 mg/kg, una dosis que había demostrado ser cardiopélica [4-6]; y 4) el grupo DOX más $\alpha 5$ ($n = 10$ ratones) alimentados con dieta estándar y que recibieron i.p. inyección de 20 mg/kg de DOX más suplementación de $\alpha 5$ (1,5 mg/g de peso corporal/día en agua de bebida). La suplementación con $\alpha 5$ se realizó durante 10 días, con un ciclo de 12 h de luz/12 h de oscuridad a 22 °C en una sala silenciosa, con temperatura y humedad controladas; la dosis única de DOX se realizó el tercer día antes del final del tratamiento con $\alpha 5$ (Figura 2). El volumen de bebida, la ingesta de alimentos y el peso corporal se controlaron dos veces por semana. Al final del periodo de tratamiento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los corazones se extrajeron rápidamente y se utilizaron en fresco (para el análisis del consumo de oxígeno) o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C (para la medición de los niveles de ADNmt, ARNm y proteínas, además del análisis de la actividad de la citrato sintasa).

Análisis cuantitativo RT-PCR

Las RT-PCR cuantitativas se realizaron como se describió previamente [3-7] con la iQ SybrGreenI SuperMix (Bio-Rad; Segrate, Italia) en un sistema de detección de PCR en tiempo real iCycler iQ (Bio-Rad). Brevemente, el ARN se aisló del ventrículo izquierdo mediante el uso del RNeasy Tissue Mini Kit (Qiagen) o de células HL-1 utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen). El ADNc se sintetizó mediante el uso del iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories). Los cebadores se diseñaron con el software Beacon Designer 2.6 de Premier Biosoft International y se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Gene			SEQ ID.	Producto PCR (pb)	T _a (°C)
Gato	CACTGACGAGATGGCACACTTTG TGGAGAACC GAACGGCAATAGG	Primer Sentido (5'-3')	No.1	173	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.2		
COX IV	TGGGACTATGACAAGAATGAGTGG TTAGCATGGACCATGGATACGG	Primer Sentido (5'-3')	No.3	113	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.4		
cit c	ATAGGGGCATGTCACCTCAAAC GTGGTTAGCCATGACCTGAAAG	Primer Sentido (5'-3')	No.5	172	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.6		
eNOS	AGCGGCTGGTACATGAGTTC GATGAGGTTGTCTGGTGTCC	Primer Sentido (5'-3')	No.7	116	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.8		

		3')			
GPX1	TCTGGGACCTCGTGGACTG CACTTCGCACTTCTCAAACAATG	Primer Sentido (5'-3')	No.9	156	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.10		
KLF15	ACACCAAGAGCAGCCACCTC TGAGATCGCCGGTGCCTTGA	Primer Sentido (5'-3')	No.11	130	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.12		
aDNmt	CCACTTCATCTTACCATTTA ATCTGCATCTGAGTTTAATC	Primer Sentido (5'-3')	No.13	106	54
		Primer antisentido (5'-3')	No.14		
NRF1	ACAGATAGTCCTGTCTGGGGAAA TGGTACATGCTCACAGGGATCT	Primer Sentido (5'-3')	No.15	99	60
		Primer antisentido (5'-3')	No. 16		
PGC-1α	ACTATGAATCAAGCCACTACAGAC TTCATCCCTCTTGAGCCTTTCG	Primer Sentido (5'-3')	No.17	148	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.18		
SESN2	GCCCCTGAGAAGCTCCGCAA GAGTTCGGCCAGGGACCAGC	Primer Sentido (5'-3')	No.19	129	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.20		
SOD1	GGCTTCTCGTCTTGCTCTC AACTGGTTCACCGCTTGC	Primer Sentido (5'-3')	No.21	153	60
		Primer antisentido (5'-3')	No. 22		
SOD2	GCCTCCCAGACCTGCCTTAC GTGGTACTTCTCCTCGGTGGCG	Primer Sentido (5'-3')	No.23	131	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.24		
TBP	ACCTTCACCAATGACTCCTATG TGACTGCAGCAAATCGCTTGG	Primer Sentido (5'-3')	No.25	186	60
		Primer antisentido (5'-3')	No. 26		
Tfam	AAGACCTCGTTTCAGCATATAACATT TTTCCAAGCCTCATTTACAAGC	Primer Sentido (5'-3')	No.27	104	60

		Primer antisentido (5'-3')	No.28		
18S	CTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAG CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTC	Primer Sentido (5'-3')	No.29	100	60
		Primer antisentido (5'-3')	No.30		
T_a temperatura de recocido (°C); Cat, catalasa; COX IV, citocromo c oxidasa subunidad IV; cit c, citocromo c; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; GPX1, glutatión peroxidasa 1; KLF15, Krüppel-like factor 15; mtDNA, ADN mitocondrial; NRF1, factor respiratorio nuclear 1; PGC-1α, coactivador 1-α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; SESN2, sestrina 2, SOD1, superóxido dismutasa 1; SOD2, superóxido dismutasa 2; TBP, proteína de unión a TATA; Tfam, factor A de transcripción mitocondrial; ARN ribosomal 18S, 18S. Número de acceso Cat: NM_009804.2; Número de acceso COX IV: NM_009941; Número de acceso Cit c: NM_007808; Número de acceso eNOS: NM_008713.4; Número de acceso GPX1: NM_008160.6; Número de acceso KLF15: NM_023184.4; Mus musculo Mitocondrial, genoma completo: NC_005089.1; Número de acceso NRF1: AF098077; PGC-1α: AF049330; Número de acceso SESN2: NM_144907.1; Número de acceso SOD1: NM_011434; Número de acceso SOD2: NM_013671; Número de acceso TBP: NM_013684.3; Número de acceso Tfam: NM_009360.4; Número de acceso 18S: X03205.					

El número de ciclo en el que los diversos transcritos eran detectables (ciclo umbral, CT) se comparó con el de TBP, denominado Δ CT. El nivel relativo de genes se expresó como $2^{-(\Delta\Delta CT)}$, en el que $\Delta\Delta CT$ es igual al Δ CT de los ratones tratados con DOX-, $\alpha 5$ -, o DOX más $\alpha 5$ (o células HL-1 tratadas) menos el Δ CT de los ratones de control (o células HL-1 no tratadas).

5 **Análisis Western blot**

Se obtuvieron extractos de proteínas del ventrículo izquierdo con el reactivo de extracción de proteínas de mamíferos T-PER (Pierce, ThermoScientific, Rockford, EE.UU.) o de células HL-1 con el reactivo de extracción de proteínas de mamíferos M-PER (Pierce, ThermoScientific, Rockford, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante, en presencia de 1 mM NaVO₄, 10 mM NaF y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, Milán, Italia). El contenido proteico se determinó por medio del ensayo de proteínas con ácido bicinónico (BCA, Pierce, Euroclone, Milán, Italia), y 50 μ g del extracto proteico se separaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras. A continuación, las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italia) [3-8]. Las proteínas de interés se detectaron con anticuerpos específicos anti-COX IV (citocromo c oxidasa subunidad IV, Cell Signaling Technology Cat #4844, Euroclone, Milán, Italia), anti-cyt c (complejo citocromo, Cell Signaling Technology Cat #4280), anti-PGC-1 α (proliferator-activated receptor y coactivador 1 α , Cell Signaling Technology Cat #2178), anti-fosfo-AKT (Ser473) (Cell Signaling Technology Cat #4060), anti-AKT (Cell Signaling Technology Cat #4685), anti-fosfo-eNOS (Ser1177) (fosfo-óxido nítrico sintasa endotelial, Cell Signaling Technology Cat #9571), anti-eNOS (Cell Signaling Technology Cat #9572), anti-fosfo-S6 (Ser235/236) (fosfo-S6, Cell Signaling Technology Cat #4858), anti-S6 (Cell Signaling Technology Cat #2217), anti-fosfo-mTOR (Ser2481) (Cell Signaling Technology Cat#2974), anti-mTOR (Cell Signaling Technology Cat#2972), anti-fosfo-BCKDH (Ser293) (Abcam Cat #200577), anti-BCKDH (Abcam Cat #138460), y anti-GAPDH (1:1000, Cell Signaling Technology Cat #2118) en dilución 1:1000 cada uno. Tras la visualización de fosfo-eNOS, fosfo-AKT, fosfo-mTOR, fosfo-S6 y anti-fosfo-BCKDH, los filtros se decaparon con el tampón de decapado para western blot Restore™ (Euroclone, Milán, Italia) y se utilizaron posteriormente para la visualización de eNOS total, AKT total, mTOR total, S6 total o BCKDH total. La inmunotinción se realizó con inmunoglobulina anti-conejo o anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante durante 1 h a temperatura ambiente. La proteína se detectó mediante el uso del sustrato SuperSignal (Pierce, Euroclone, Milán, Italia) y se cuantificó por densitometría con el software de análisis de imágenes ImageJ.

ADN mitocondrial

Para el análisis del ADNmt, se extrajo el ADN total con un kit de extracción de ADN QIAamp (Qiagen). El ADNmt se amplificó mediante el uso de cebadores específicos para el ADNmt y se normalizó con el gen 18S (Tabla 2) [9]. El contenido de ADNmt se determinó por medio de qRT-PCR midiendo la relación de ciclo umbral (Δ CT) del gen de ADNmt frente al de un gen codificado nuclear (18S) en ventrículo izquierdo de ratones tratados con DOX-, $\alpha 5$ - o DOX más $\alpha 5$, además de ratones control no tratados [10,11].

Actividad del citrato sintasa

La actividad se midió espectrofotométricamente a 412 nm a 30°C en extractos de ventrículo izquierdo [12,13]. El tejido se añadió a un tampón que contenía 0,1 mM de ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico), 0,5 mM de oxaloacetato,

50 μM de EDTA, 0,31 mM de acetil CoA, 5 mM de clorhidrato de trietanolamina y 0,1 M de Tris-HCl (pH 8,1). La actividad de la citrato sintasa se expresó como nmol de citrato producido por minuto y por mg de proteína. Los datos se normalizaron con respecto al contenido total de proteínas, que se determinó por medio del ensayo del ácido bicinchonínico, como se ha indicado anteriormente.

5 **Consumo de oxígeno**

El consumo de oxígeno se midió como se describe [14,15]. Se aislaron mitocondrias del ventrículo izquierdo de ratones de control y tratados. Las muestras se analizaron a 37 °C en un recipiente hermético al gas equipado con un electrodo de oxígeno tipo Clark (Rank Brothers Ltd.) conectado a un registrador gráfico. El electrodo de oxígeno se calibró suponiendo que la concentración de oxígeno en el medio de incubación era de 200 $\mu\text{mol/l}$ a 37 °C.

10 **Estrés oxidativo mitocondrial**

Para investigar el estrés oxidativo mitocondrial, se aislaron mitocondrias mediante el uso del kit de aislamiento de mitocondrias Qproteome (Qiagen). La liberación mitocondrial de H_2O_2 se midió en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP), mediante el uso del kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Molecular Probes). Las medidas fluorométricas se realizaron mediante el uso de un analizador de microplacas Fusion Universal (Packard/PerkinElmer) con filtro de excitación a 550 nm y filtro de emisión a 590 nm. La producción de H_2O_2 , calculada a partir de una curva estándar, se expresó como nmol/ min/mg de proteína como se ha descrito [9]. Además, la actividad de la aconitasa mitocondrial y la SOD se midieron como se ha descrito previamente [16]. Brevemente, la formación de NADPH se siguió espectrofotométricamente (340 nm) a 25°C (para la actividad aconitasa), mientras que la actividad SOD se midió con el Superoxide Dismutase Assay Kit (Calbiochem). Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para presentar un 50% de desmutación del radical superóxido. Por último, se midió el daño oxidativo del ADN como otro marcador del estrés oxidativo. Se utilizó el kit ELISA de comprobación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) de alta sensibilidad (JalCA, Hamamatsu, Japón) [17]. Las mediciones se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN total se extrajo con el kit QlampDNAMini (Qiagen) y se digirió con la nucleasa P1 y la fosfatasa alcalina (Sigma). La calidad y la cantidad del ADN se confirmaron por medio de un análisis de espectrofotometría NanoDrop ND-1000. La absorbancia del producto de la reacción ELISA se determinó espectrofotométricamente mediante el uso de 450 nm como onda primaria.

Ensayo de viabilidad

La viabilidad de las células HL-1 se evaluó por medio del reactivo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio] (Sigma, Milán, Italia). Se sembraron HL-1 en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células/pocillo (100 μl). Los cristales de formazán púrpura se disolvieron en SDS al 5%/0,1 M de HCl (100 μl /pocillo), y la absorbancia se registró en un lector de microplacas (ELx800, BioTek Instruments, VT, EE.UU.) a una longitud de onda de 570 nm. Cada prueba se repitió al menos cuatro veces por cuadruplicado.

Ensayo de fosfatasa ácida

35 Para cuantificar el crecimiento celular de MCF7, se utilizó el ensayo de fosfatasa ácida descrito [30]. Brevemente, se colocaron células MCF7 en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 a 20.000 células por pocillo y se trataron con 1 % $\alpha 5$ (durante 48 h) y 1 μM DOX (durante 16 h). Se retiró el medio de cultivo y cada pocillo se lavó una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2), y se añadió con 100 μl de tampón que contenía acetato sódico 0,1 M (pH 5,0), 0,1% de Titon X-100 y 5 mM de p-nitrofenilfosfatasa (pNPP). A continuación, las placas se colocaron en una incubadora a 37 °C durante 2 h. La reacción se detuvo con la adición de 10 μl de NaOH 1 N, y el desarrollo del color se evaluó a 405 nm. La hidrólisis no enzimática de pNPP se midió en pocillos sin células.

Análisis estadístico y presentación de datos

El análisis estadístico se realizó con un ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls o la prueba t de Student. Los datos se presentan como medias $\pm$ desviaciones estándar (DE), a menos que se especifique lo contrario. Se aceptó una diferencia estadísticamente significativa en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Una composición específica a base de aminoácidos previene la disfunción mitocondrial en cardiomiocitos HL-1 expuestos agudamente a DOX

50 A fin de proteger a los cardiomiocitos contra la toxicidad del DOX, se ha corregido el deterioro de la función mitocondrial y el estrés oxidativo en las células HL-1 expuestas al quimioterapéutico. Se evaluó una combinación óptima de precursores metabólicos relevantes capaces de aumentar al máximo el metabolismo oxidativo en cardiomiocitos HL-1. Concretamente, se probó el efecto de dos composiciones a base de aminoácidos (Tabla 1) en células HL-1 diferenciadas. Para este cribado, se trataron cardiomiocitos diferenciadores durante 48 h con 1) una composición que comprende aminoácidos de cadena ramificada (es decir, BCAAem) o 2) la composición objeto de la presente solicitud "a5", que también comprende ácidos tricarbóxicos, con o sin DOX (Figura 1). Mientras que el $\alpha 5$

(1% p/v) aumentó los niveles de ARNm de los marcadores de biogénesis mitocondrial en las células HL-1, incluyendo PGC-1 α , factor respiratorio nuclear 1 (NRF1), factor de transcripción mitocondrial A (Tfam), citocromo c (citocromo c), y citocromo c oxidasa complejo IV (COX IV) sobre el valor basal, sólo la expresión de PGC-1 α se incrementó por BCAAem (Figura 3A). Por el contrario, la expresión de estos genes disminuyó cuando los cardiomiocitos se expusieron a 1 μ M de DOX durante 16 h (Figura 3A). Notablemente, la suplementación con α 5 previno esta toxicidad del DOX con un rescate completo de la expresión génica (Figura 3A). Excepto para cyt c y COX IV, BCAAem fue incapaz de revertir el efecto DOX con significación estadística (Figura 3A). De ahí que en lo sucesivo se utilizara la composición α 5. Notablemente, la Figura 4 muestra que los intermediarios TCA - ácido cítrico, ácido succínico y ácido málico suplementados individualmente o todos juntos a las mismas concentraciones en α 5 - fueron incapaces de prevenir la reducción de la biogénesis mitocondrial inducida por DOX así como de cambiar la expresión génica mitocondrial cuando se suplementaron solos. La capacidad protectora de la suplementación con α 5 sobre la salud mitocondrial también fue evidente a nivel proteico (por ejemplo, COX IV y, con una tendencia, cyt c) (Figura 3B). Además, la reducción de la actividad de la citrato sintasa promovida por la exposición al DOX -que es un índice de la reducción de la masa y la función mitocondrial- fue totalmente antagonizada por la suplementación con α 5, que elevó la actividad enzimática también cuando se añadió sola a las células HL-1 (Figura 3C). Estos efectos saludables de α 5 sobre el daño mitocondrial inducido por DOX se confirmaron además por la reducción del estrés oxidativo. En comparación con las células no tratadas, la liberación de H₂O₂ (un índice de la producción de anión superóxido mitocondrial) aumentó notablemente con el tratamiento con DOX; la suplementación con α 5 evitó este efecto (Figura 5A). α 5 también redujo la liberación de H₂O₂ cuando se añadió sola. En consecuencia, las mediciones de la producción mitocondrial de ROS (evaluada por el cociente de actividad aconitasa basal/total) y la capacidad de eliminar superóxidos por medio de la actividad SOD demostraron que la suplementación con α 5 prevenía el estrés oxidativo inducido por DOX, con efectos beneficiosos también cuando se añadía sola (Figura 5, B y C). Dado que el estrés oxidativo activa el sistema de defensa anti-ROS, se investigó la expresión de enzimas anti-ROS. En particular, la expresión de los genes de la glutatión peroxidasa 1 (GPX1) y la superóxido dismutasa 1 (SOD1) aumentó en las células HL-1 tratadas con DOX en comparación con las no tratadas (Figura 5D), en consonancia con el aumento de la producción de ROS.

Esto se confirmó por la mayor cantidad de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), un marcador de daño oxidativo del ADN, en las células expuestas a DOX (Figura 5E). La suplementación con α 5 en las células tratadas con DOX fue capaz de contrarrestar la producción de ROS, como lo demuestra la reducción de la expresión de los genes SOD1 y GPX1 (Figura 5D) y el restablecimiento de la producción de 8-OHdG a la cantidad observada en las células no tratadas (Figura 5E). La figura 5D muestra además que α 5 es más eficaz que BCAAem en la protección anti-ROS. En conjunto, estos resultados apoyan la noción de que la mezcla α 5 puede prevenir el daño mitocondrial inducido por la exposición aguda a DOX en cardiomiocitos HL-1. En particular, esto podría tener un impacto relevante en la supervivencia celular. De hecho, la muerte de las células HL-1 inducida por DOX fue evitada por la mezcla α 5 cuando se complementaron (Figura 6). No se observó ningún efecto sobre la supervivencia celular cuando las células HL-1 se expusieron únicamente a α 5 (Figura 6).

Composición α 5 previene la disfunción mitocondrial en el corazón de ratones tratados con DOX

A fin de confirmar los resultados *in vitro*, se realizó un tratamiento agudo *in vivo* con DOX como se describe [6]. El tercer día antes de finalizar el tratamiento α 5 -que se realizó durante 10 días- se realizó una única inyección i.p. de 20 mg/kg de DOX (Figura 2). La Tabla 3 muestra que el tratamiento con DOX disminuyó significativamente el peso corporal y el peso cardíaco en comparación con el grupo control, y esto podría depender de su marcado efecto anorexígeno. α 5 fue incapaz de modificar el peso corporal, el peso cardíaco y la ingesta de alimentos tanto cuando se suplementó solo como con DOX (Tabla 3). Por el contrario, mientras que el consumo de agua en los ratones tratados con DOX no varió en comparación con los animales de control, el α 5 aumentó la ingesta de agua cuando se suplementó solo o con DOX.

Tabla 3

	CTRL	α 5	DOX	DOX+ α 5
Peso corporal (g)	24,84 $\pm$ 1,3	24,46 $\pm$ 2	20,75 $\pm$ 0,82*	20,46 $\pm$ 1,04*
Peso del corazón (g)	0,12 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02	0,085 $\pm$ 0,02*	0,09 $\pm$ 0,02*
Ingesta de alimentos (g)	5,2 $\pm$ 0,41	5,34 $\pm$ 0,7	3,73 $\pm$ 0,6*	3,59 $\pm$ 0,47*
Ingesta de agua (g)	6,1 $\pm$ 0,7	8,24 $\pm$ 0,88*	6,13 $\pm$ 1,0	7,07 $\pm$ 1,3

Las mediciones se realizaron en 10 ratones por grupo. Los valores representan la media $\pm$ D.S. *p < 0,05 frente a los controles (es decir, ratones inyectados con solución salina).

Los niveles de ARNm de los genes de la biogénesis mitocondrial se redujeron en el ventrículo izquierdo de los ratones tratados con DOX en comparación con el grupo de control (Figura 7A). Además de aumentar los niveles de ARNm de PGC-1 α , cyt c y COX IV cuando se suplementó sola, la mezcla α 5 fue capaz de prevenir

significativamente la reducción inducida por DOX de PGC-1 α , Tfam y cyt c (Figura 7A). La masa y la función mitocondriales, medidas como la cantidad de ADN mitocondrial (ADNmt), las proteínas respiratorias (en particular la COX IV) y la actividad de la citrato sintasa fueron menores en los ratones tratados con DOX que en los tratados con solución salina, y estas reducciones se evitaron cuando los ratones recibieron suplementos de $\alpha 5$ (Figura 7, B-D). Además, se investigó la función respiratoria mitocondrial midiendo la tasa de consumo de oxígeno (TCO) con el electrodo de Clark en mitocondrias aisladas del ventrículo izquierdo de los diversos grupos de tratamiento. La Figura 7E muestra que la inyección de DOX disminuyó la OCR, mientras que la suplementación con $\alpha 5$ conservó totalmente la respiración mitocondrial de los ratones tratados con DOX. La mezcla de aminoácidos también aumentó la OCR cuando se administró sola (Figura 7E). Por último, los resultados descritos en la Figura 7F confirmaron en muestras *ex vivo* que el DOX aumentó la expresión de enzimas de defensa frente a ROS, incluyendo SOD1, SOD2, catalasa y GPX1, mientras que la suplementación con $\alpha 5$ bloqueó casi por completo este efecto. No se observaron cambios en los ratones tratados únicamente con $\alpha 5$ (Figura 7F). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la suplementación con $\alpha 5$ previene la toxicidad mitocondrial inducida por DOX en el corazón, al menos en parte, por medio de la promoción de la biogénesis y la función mitocondrial, así como por medio de la reducción del estrés oxidativo.

Diferentes vías de señalización están implicadas en los efectos protectores de la suplementación con $\alpha 5$

Se analizaron las vías de señalización en el ventrículo izquierdo de ratones tratados con DOX y $\alpha 5$. Las figuras 8A y B muestran que la inyección de DOX disminuyó la expresión de la eNOS, aunque sólo parcialmente la actividad de la eNOS [es decir, la relación (Ser1177)fosfo-eNOS/eNOS total]. Cabe destacar que la suplementación con $\alpha 5$ neutralizó por completo estos efectos. Cuando se suplementó sola la composición $\alpha 5$ fue capaz de aumentar la expresión de eNOS (Figura 8A). Dado que se sabe que la producción de óxido nítrico (NO) dependiente de la eNOS regula a su vez la vía de señalización del complejo 1 de mTOR (mTORC1), y que la actividad de mTORC1 es necesaria y suficiente para la fosforilación (Ser1177)-eNOS en diferentes tipos celulares, se midió la fosforilación de S6 como marcador descendente de la activación de mTORC1. El tratamiento con DOX redujo la proporción entre (Ser235/236)fosfo-S6 y S6 total en el ventrículo izquierdo en comparación con la inyección salina, mientras que la suplementación con $\alpha 5$ evitó este efecto al menos parcialmente (Figura 8C). No se observaron cambios significativos con la mezcla $\alpha 5$ cuando se suplementó sola. Diversos estímulos fisiológicos modulan la señalización de mTORC1 por medio de la fosforilación de mTOR en sitios específicos. Los datos divulgados en la presente memoria desvelan un papel funcional para la fosforilación Ser2481 de mTOR en la acción de DOX y $\alpha 5$, en la que DOX redujo y $\alpha 5$ rescató esta reducción de la fosforilación selectiva de mTOR en corazón (Figura 8D). La fosforilación de mTOR aumentó también cuando se añadió $\alpha 5$ solo. En conjunto, los resultados sugieren que tanto eNOS como mTORC1 pueden desempeñar un papel en los efectos del tratamiento con DOX y $\alpha 5$.

Enfatizando esta hipótesis, Sestrin2 ha sido recientemente propuesto como un sensor de leucina para la vía mTORC1, dado que altos niveles de Sestrin2 inhiben la actividad mTORC1 cuando las concentraciones intracelulares de leucina son bajas. Por el contrario, los bajos niveles de Sestrin2 o las altas concentraciones intracelulares de leucina -que desplazan a Sestrin2 del inhibidor de mTORC1 GATOR2- promueven la activación de mTORC1. Dado que la composición $\alpha 5$ contiene una elevada cantidad de leucina, se midió la expresión de Sestrin2. El tratamiento con DOX aumentó notablemente el ARNm de Sestrin2 en el ventrículo izquierdo (Figura 8E). Notablemente, $\alpha 5$ previno completamente este efecto inducido por DOX, aunque no pudo cambiar la expresión de Sestrin2 cuando se suplementó solo (Figura 8E).

De manera similar, el factor 15 similar a Krüppel (KLF15) ha surgido recientemente como un regulador transcripcional crítico del metabolismo de aminoácidos, en particular el catabolismo de BCAA (es decir, la oxidación de BCAA con producción de acetil-CoA y succinil-CoA, dos intermediarios de TCA), especialmente en el corazón, así como un inductor de la expresión de eNOS en células endoteliales. De este modo, se analizó la expresión de KLF15 en el ventrículo izquierdo de los distintos grupos de tratamiento. Los niveles de ARNm de Klf15 se redujeron significativamente con el tratamiento con DOX, y esta reducción se evitó completamente con la suplementación con $\alpha 5$ (Figura 8F). No se observaron cambios significativos cuando se suplementó $\alpha 5$ solo (Figura 8F). Dado que la expresión o la actividad de las enzimas catabólicas mitocondriales de los BCAA, tales como el complejo α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDH), en el tejido cardíaco se reduce en los ratones Klf15-nulos y en la insuficiencia cardíaca, se investigó la transcripción de la proteína BCKDH, además de la fosforilación de BCKDH en los animales tratados con DOX. Cuando está fosforilada, la BCKDH está inactiva, mientras que cuando está desfosforilada está activa. En particular, la fosforilación (Ser293)-BCKDH no se modificó en los ratones tratados con DOX en comparación con los tratados con solución salina, mientras que la suplementación con $\alpha 5$ la redujo notablemente en presencia de DOX, con un efecto de tendencia inhibitoria también cuando se suplementó sola (Figura 8G). En conjunto, estos resultados sugieren que la protección *in vivo* de la homeostasis mitocondrial en el tejido cardíaco por medio de la suplementación con $\alpha 5$ podría estar relacionada con un eje de señalización KLF15/eNOS/mTORC1, que implica el catabolismo de los BCAA.

También se evaluó el impacto de KLF15, eNOS y mTORC1 en la homeostasis mitocondrial en células HL-1 expuestas a DOX y $\alpha 5$. En primer lugar, aunque la expresión génica de la eNOS sólo disminuyó ligeramente con la exposición a 1 μ M de DOX, la fosforilación (Ser1177)-eNOS se redujo notablemente (Figura 9, A y B). $\alpha 5$ (1 % p/v) antagonizó totalmente ambos efectos inhibidores de DOX, aumentando masivamente la expresión de la eNOS también cuando se suplementó sola (Figura 9, A y B). En segundo lugar, la fosforilación (Ser235/236)-S6 se redujo

notablemente por DOX, y esta reducción fue totalmente antagonizada por $\alpha 5$ (Figura 9C). Por el contrario, la mezcla de aminoácidos fue ineficaz cuando se añadió sola. De acuerdo con su papel como controlador de mTORC1, la expresión de Sestrin2 aumentó notablemente por DOX, y este aumento fue totalmente antagonizado por la suplementación con $\alpha 5$ (Figura 9D). La composición de aminoácidos era ineficaz cuando se añadía sola. En tercer lugar, en base al papel modulador de Akt, también conocida como proteína quinasa B (PKB), sobre la activación tanto de eNOS como de mTORC1, se estudió también la fosforilación (Ser 473)-Akt en células HL-1 tratadas con DOX y $\alpha 5$. DOX redujo notablemente la fosforilación de Akt, mientras que $\alpha 5$ evitó este efecto (Figura 5E). Dado que recientemente se descubrió que la vía de señalización Akt/PKB media el efecto de los BCAA sobre la expresión de KLF15, se investigó el papel de este regulador de la transcripción en el impacto protector del suplemento $\alpha 5$ sobre el daño mitocondrial mediado por DOX. En particular, la expresión de KLF15 se redujo tanto a nivel de ARNm como de proteína cuando las células HL-1 se expusieron a DOX, y $\alpha 5$ antagonizó totalmente este efecto (Figura 9F). Sólo se observó un ligero aumento, no estadísticamente significativo, de la expresión de KLF15 en los cardiomiocitos HL-1 expuestos únicamente a $\alpha 5$ (Figura 9F).

A continuación, las células HL-1 se transfectaron con ARNsi Klf15 específico o con ARNsi no selectivo. La eficacia del silenciamiento se midió tanto a nivel de ARNm como de proteínas (Figura 10). La exposición al DOX disminuyó significativamente tanto la proteína PGC-1 α como la COX IV en células transfectadas con siRNA Klf15 o no tratadas (Figura 9G). Por el contrario, la caída de Klf15 redujo notablemente los niveles de PGC1- α y COX IV *per se* y abolió la capacidad de la suplementación con $\alpha 5$ para rescatar los niveles de proteína cuando se administró con DOX (Figura 9G). Además, la caída de Klf15 redujo notablemente la capacidad de $\alpha 5$ para promover la expresión de PGC1- α y COX IV cuando se añadió $\alpha 5$ solo (Figura 9G). Cabe destacar que la caída de Klf15 mermó masivamente la capacidad de $\alpha 5$ para restaurar la fosforilación (Ser235/236)-S6 reducida por DOX (Figura 9H). Por último, mientras que la fosforilación (Ser293)-BCKDH no fue diferente entre los cardiomiocitos HL-1 tratados con DOX y los de control no tratados, la p-BCKDH desapareció por completo cuando las células se expusieron a $\alpha 5$, con o sin DOX (Figura 9H). La caída de Klf15 previno parcialmente el efecto inhibitorio de $\alpha 5$ sobre la fosforilación (Ser293)-BCKDH tanto en células tratadas con DOX como en células no tratadas, mientras que el DOX fue incapaz de cambiar la fosforilación cuando se añadió solo (Figura 9H). Del mismo modo, el silenciamiento de eNOS y Raptor -una de las proteínas del andamiaje de mTORC1 (proteína asociada a la regulación de mTOR)- con siRNAs específicos redujo los niveles de PGC1- α y COX IV *per se* y abolió la capacidad de la suplementación con $\alpha 5$ para rescatar los niveles reducidos de proteína cuando se administró con DOX (Figura 11, A y B). Tanto la caída de eNOS como la de Raptor no cambiaron la expresión de PGC1- α y COX IV cuando se añadió $\alpha 5$ solo (Figura 11, A y B). La eficacia del silenciamiento específico se evaluó por medio de RT-PCR y Western blot; se obtuvo una reducción de casi el 70% y el 60% de eNOS y mTORC1 con ARNsi de eNOS y Raptor, respectivamente (Figura 10, B y C). En conjunto, estos hallazgos sugieren que los efectos protectores de la mezcla $\alpha 5$ sobre la disfunción mitocondrial mediada por DOX en cardiomiocitos podrían estar relacionados con un eje de señalización KLF15/eNOS/mTORC1 y el catabolismo de BCAA.

El efecto antiproliferativo del DOX permaneció inalterado en las células de cáncer de mama MCF7 en presencia de la composición $\alpha 5$

La exposición de la línea celular de cáncer de mama MCF7 a la composición $\alpha 5$ no promovió la proliferación celular MCF7, como se evaluó con dos ensayos diferentes (Figura 13A y 13B). Del mismo modo, el efecto antiproliferativo del DOX en las células MCF7 no se vio afectado en absoluto por la presencia del aminoácido (Figura 13A y 13B). Resulta muy interesante que el efecto del DOX se potencia cuando se administra junto con la composición $\alpha 5$.

Como se describió en la sección anterior, aunque la antraciclina DOX (nombre comercial Adriamycin) es un fármaco antineoplásico altamente eficaz y frecuentemente utilizado desde su introducción en la década de 1960, causa una cardiotoxicidad relacionada con la dosis que puede conducir a insuficiencia cardíaca grave. Si el DOX ha dañado el corazón, las opciones de tratamiento son escasas. Normalmente, la cardiomiopatía y la insuficiencia cardíaca inducidas por DOX son refractarias al tratamiento convencional [1]. Cada vez se hacen más esfuerzos para predecir qué pacientes se verán afectados por la cardiotoxicidad del DOX -incluido el análisis de los cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas específicos de cada paciente- y para prevenir adecuadamente este riesgo, para lo que se han propuesto, sin resultados concluyentes, fármacos como los agentes quelantes del hierro, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los β -bloqueantes, los antioxidantes y los productos naturales o complementos alimenticios. En la presente memoria, se ha probado la eficacia de la composición $\alpha 5$ y de la composición BCAAem para prevenir el daño mitocondrial inducido por DOX en cardiomiocitos HL-1 cultivados. $\alpha 5$ fue estadísticamente más eficaz que BCAAem para contrarrestar el déficit de marcadores de biogénesis mitocondrial inducido por DOX. La suplementación dietética de $\alpha 5$ activa un eje de señalización KLF15/Akt/eNOS/mTORC1 (Figura 12). Estos resultados tampoco excluyen un papel de mTORC2, una vía de señalización que parece ser esencial para el desarrollo cardíaco normal y para el mantenimiento de la estructura y función cardíaca postnatal, especialmente para adaptarse a condiciones de estrés. Sin embargo, mTORC2 no ha sido hasta ahora implicado, en la cardiotoxicidad del DOX. Además, los hallazgos actuales sobre KLF15 y Sestrin2 también ponen en duda la relevancia de la señalización mTORC2 en este modelo experimental. Uno de los hallazgos más relevantes mostrados en la presente aplicación es la regulación masiva a la baja de las proteínas PGC-1 α y COX-IV -que son marcadores de la biogénesis mitocondrial- inducida por el silenciamiento de KLF15 en cardiomiocitos HL-1. La familia Kruppel-like factors (KLF) de reguladores transcripcionales Cys2/His2 zinc-finger controla muchos aspectos de la estructura y la función de los cardiomiocitos y las mitocondrias. Es importante

destacar que KLF15 regula la transcripción de Wnt/ β -catenina y controla el destino de las células progenitoras cardíacas en el corazón postnatal, lo que sugiere un papel en el desarrollo cardíaco.

La presente solicitud muestra que los cardiomiocitos silenciados por Klf15-, eNOS y Raptor no respondieron al $\alpha 5$, que fue incapaz de promover la biogénesis mitocondrial *per se* y de proteger el daño mitocondrial cuando se suplementó con DOX. Además, tras un tratamiento de 72 h con DOX, la expresión del gen Klf15 se redujo en el tejido cardíaco.

La suplementación con $\alpha 5$ previene la disfunción mitocondrial inducida por DOX agudo al promover 1) la biogénesis mitocondrial, 2) el sistema de defensa anti-ROS, y 3) la oxidación de BCAA, con una probable producción de intermediarios TCA, aparentemente de una manera dependiente de mTORC1 (Figura 12).

La caída de Klf15-de hecho redujo marcadamente la actividad mTORC1 en células HL-1 y deterioró la capacidad de la mezcla $\alpha 5$ para restaurar la fosforilación S6 comprometida por DOX. Del mismo modo, el silenciamiento de Klf15 impidió parcialmente la activación del catabolismo de BCAA inducida por $\alpha 5$ -medida como fosforilación de BCKDH- tanto en cardiomiocitos tratados con DOX como en cardiomiocitos no tratados. Esto sugiere que en las células cardíacas el efecto protector de la $\alpha 5$ está mediado, al menos en parte, por la activación de mTORC1, que depende de la expresión de KLF15 y, por tanto, de la oxidación de los BCAA. Además, en células y tejidos cardíacos $\alpha 5$ restauró a niveles de control Sestrin2, que se expresa altamente tras el tratamiento con DOX. Las estrinas son una familia de proteínas inducibles por estrés (Sestrin1-3) y diversas pruebas indican que Sestrin2 es un sensor de leucina para la vía mTORC1. Normalmente unida a GATOR2, que queda inhibida de este modo en condiciones de ausencia de estrés, Sestrin2 se desplaza de GATOR2 cuando la leucina está presente en concentraciones intracelulares micromolares, activando mTORC1. La composición $\alpha 5$ promovió la expresión y la actividad de la eNOS, tanto en células y tejidos cardíacos tratados con DOX como en los no tratados. Probablemente estos efectos fueron mediados por la fosforilación (Ser473)-Akt.

Curiosamente, aunque el papel de las composiciones a base de aminoácidos en el apoyo nutricional de pacientes con cáncer ha sido, hasta ahora, claramente definido, la presente solicitud muestra que la exposición de la línea celular de cáncer de mama MCF7 a la composición $\alpha 5$ no promovió la proliferación celular MCF7, como se evaluó con dos ensayos diferentes (Figura 13A y 13B). Del mismo modo, el efecto antiproliferativo del DOX en las células MCF7 no se vio afectado en absoluto por la presencia del aminoácido (Figura 13A y 13B). Resulta muy interesante que la tasa de proliferación se reduce cuando se administra la composición $\alpha 5$.

En general, los resultados comunicados en la presente memoria han demostrado: 1) que el tratamiento agudo con DOX induce disfunción mitocondrial tanto en el tejido cardíaco como en los cardiomiocitos, 2) que la composición $\alpha 5$ previene notablemente este daño, 3) que las vías de señalización eNOS y mTORC1 están crucialmente implicadas en la acción de este protector, 4) que KLF15, un factor de transcripción específico particularmente importante en el desarrollo cardíaco y la regulación circadiana, desempeña un papel relevante en el control de estos ejes de señalización, 5) el efecto antiproliferativo del DOX en las células MCF7 no se vio afectado en absoluto por la presencia del aminoácido.

Estos resultados ponen de relieve la eficacia de la composición $\alpha 5$ en la prevención y el tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por agentes quimioterapéuticos, tales como por ejemplo la doxorubicina, en individuos sometidos a quimioterapia.

REFERENCIAS

1. Singal, P.K.; Iliskovic, N. Cardiomiopatía inducida por doxorubicina. N. Engl. J. Med. 1998, 339, 900-5.
2. Claycomb, W.C.; Lanson, N.A.; Stallworth, B.S.; Egeland, D.B.; Delcarpio, J.B.; Bahinski, A.; Izzo, N.J. Células HL-1: línea celular de músculo cardíaco que se contrae y conserva las características fenotípicas del cardiomiocito adulto. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998, 95, 2979-84.
3. Vettor, R.; Valerio, A.; Ragni, M.; Trevellin, E.; Granzotto, M.; Olivieri, M.; Tedesco, L.; Ruocco, C.; Fossati, A.; Fabris, R.; et al. El entrenamiento aumenta la biogénesis mitocondrial dependiente de la eNOS en el corazón de ratón: papel en la adaptación del metabolismo de la glucosa. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2014, 306, E519-28.
4. Gao, J.; Chen, T.; Zhao, D.; Zheng, J.; Liu, Z. Ginkgolide B Exerts Cardioprotective Properties against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Regulating Reactive Oxygen Species, Akt and Calcium Signaling Pathways In Vitro and In Vivo. PLoS One 2016, 11, e0168219.
5. Palanivel, R.; Eguchi, M.; Shuralyova, I.; Coe, I.; Sweeney, G. Distintos efectos del tratamiento con leptina a corto y largo plazo sobre la captación de glucosa y ácidos grasos y el metabolismo en cardiomiocitos HL-1. Metabolismo. 2006, 55, 1067-75.
6. Abdullah, C.S.; Alam, S.; Aishwarya, R.; Miriyala, S.; Bhuiyan, M.A.N.; Panchatcharam, M.; Pattillo, C.B.; Orr, A.W.; Sadoshima, J.; Hill, J.A.; et al. Cardiomiopatía inducida por doxorubicina asociada a la inhibición del proceso de degradación autofágica y a defectos en la respiración mitocondrial. Sci. Rep. 2019, 9, 2002.
7. Tedesco, L.; Valerio, A.; Cervino, C.; Cardile, A.; Pagano, C.; Vettor, R.; Pasquali, R.; Carruba, M.O.; Marsicano, G.; Lutz, B.; et al. El bloqueo del receptor cannabinoide tipo 1 promueve la biogénesis mitocondrial a través de la expresión de óxido nítrico sintasa endotelial en adipocitos blancos. Diabetes 2008, 57, 2028-36.

8. Frontini, A.; Bertolotti, P.; Tonello, C.; Valerio, A.; Nisoli, E.; Cinti, S.; Giordano, A. Fosforilación de STAT3 dependiente de leptina en el hipotálamo postnatal de ratón. *Brain Res.* 2008, 1215, 105-115
9. D'Antona, G.; Ragni, M.; Cardile, A.; Tedesco, L.; Dossena, M.; Bruttini, F.; Caliaro, F.; Corsetti, G.; Bottinelli, R.; Carruba, M.O.; et al. La suplementación con aminoácidos ramificados promueve la supervivencia y favorece la biogénesis mitocondrial del músculo cardíaco y esquelético en ratones de mediana edad. *Cell Metab.* 2010, 12, 362-372.
10. Flamment, M.; Gueguen, N.; Wetterwald, C.; Simard, G.; Malthiery, Y.; Ducluzeau, P.-H. Efectos del antagonista cannabinoide CB1 rimonabant sobre la función mitocondrial hepática en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009, 297, E1162-70.
11. Sparks, L.M.; Xie, H.; Koza, R.A.; Mynatt, R.; Hulver, M.W.; Bray, G.A.; Smith, S.R. Una dieta rica en grasas reduce de forma coordinada los genes necesarios para la fosforilación oxidativa mitocondrial en el músculo esquelético. *Diabetes* 2005, 54, 1926-33
12. López-Lluch, G.; Hunt, N.; Jones, B.; Zhu, M.; Jamieson, H.; Hilmer, S.; Cascajo, M. V.; Allard, J.; Ingram, D.K.; Navas, P.; et al. La restricción calórica induce la biogénesis mitocondrial y la eficiencia bioenergética. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006, 103, 1768-1773.
13. Tedesco, L.; Corsetti, G.; Ruocco, C.; Ragni, M.; Rossi, F.; Carruba, M.O.; Valerio, A.; Nisoli, E. Una fórmula específica de aminoácidos previene la enfermedad hepática alcohólica en roedores. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2018, 314, G566-G582
14. Nisoli, E. Biogénesis mitocondrial en mamíferos: El papel del óxido nítrico endógeno. *Ciencia (80-.).* 2003, 299, 896-899.
15. Valerio, A.; Cardile, A.; Cozzi, V.; Bracale, R.; Tedesco, L.; Pisconti, A.; Palomba, L.; Cantoni, O.; Clementi, E.; Moncada, S.; et al. El TNF-alfa regula a la baja la expresión de la eNOS y la biogénesis mitocondrial en la grasa y el músculo de roedores obesos. *J. Clin. Invierte.* 2006, 116, 2791-8.
16. Lionetti, L.; Mollica, M.P.; Crescenzo, R.; D'Andrea, E.; Ferraro, M.; Bianco, F.; Liverini, G.; Iossa, S. Skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis. *Int. J. Obes.* 2007, 31, 1596-1604.
17. Pervin, S.; Singh, R.; Hernandez, E.; Wu, G.; Chaudhuri, G. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/mTOR pathway. *Cancer Res.* 2007, 67, 289-99.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para uso en la prevención y/o en el tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por al menos un agente quimioterapéutico en un individuo sometido a quimioterapia, la composición que comprende un agente activo, dicho agente activo que contiene los aminoácidos leucina, isoleucina, valina, treonina, lisina y ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico.
- 10 2. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente quimioterapéutico se selecciona en el grupo que consiste en antraciclinas, inhibidores de HER2/ErbB2, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular, inhibidores de punto de control inmune, dichas antraciclinas se seleccionan preferentemente en el grupo que consiste en doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, idarrubicina, pixantrona, sabarrubicina, valrubicina, derivados de los mismos.
- 15 3. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la relación en peso entre la suma de ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico y la suma de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina, valina más lisina y treonina está comprendida entre 0,05 y 0,3, preferentemente entre 0,1 y 0,25.
- 20 4. Composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación en peso entre la cantidad global de ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico y la cantidad global de los aminoácidos de cadena ramificada leucina, isoleucina, valina está comprendida entre 0,1 y 0,4, preferentemente entre 0,15 y 0,35.
- 5 5. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación en peso entre el ácido cítrico y la suma del ácido málico y el ácido succínico está comprendida entre 1,0 y 4,0, preferentemente entre 1,5 y 2,5.
- 25 6. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación en peso ácido cítrico:ácido málico:ácido succínico está comprendida entre 10:1:1 y 2:1,5:1,5, preferentemente entre 7:1:1 y 1,5:1:1, más preferentemente entre 5:1:1 y 3:1:1.
- 30 7. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente activo comprende además al menos un aminoácido seleccionado en el grupo que consiste en histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, tirosina, cisteína.
8. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho agente activo comprende además histidina, fenilalanina, metionina, triptófano, cisteína y opcionalmente tirosina.
- 35 9. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación entre la cantidad molar global de ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico y la cantidad molar global de metionina, fenilalanina, histidina y triptófano es superior a 1,35.
10. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación entre la cantidad molar global de los tres ácidos ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico y la cantidad molar global de lisina y treonina está comprendida entre 0,10 y 0,70, preferentemente entre 0,15 y 0,55.
- 40 11. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el peso o la cantidad molar de ácido cítrico es superior al peso o la cantidad molar global tanto de ácido málico como de ácido succínico.
12. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación en peso entre la leucina y el ácido cítrico está comprendida entre 5 y 1, preferentemente entre 2,50 y 3,50.
13. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición no contiene arginina.
14. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición no contiene serina, prolina, alanina.
- 45 15. Preparación combinada que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y al menos un agente quimioterapéutico para uso simultáneo, separado, secuencial en la prevención y/o tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por dicho al menos un agente quimioterapéutico en un individuo afectado por cáncer.

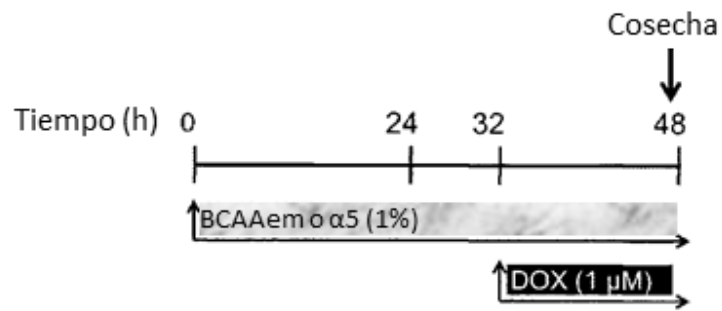


Figura 1

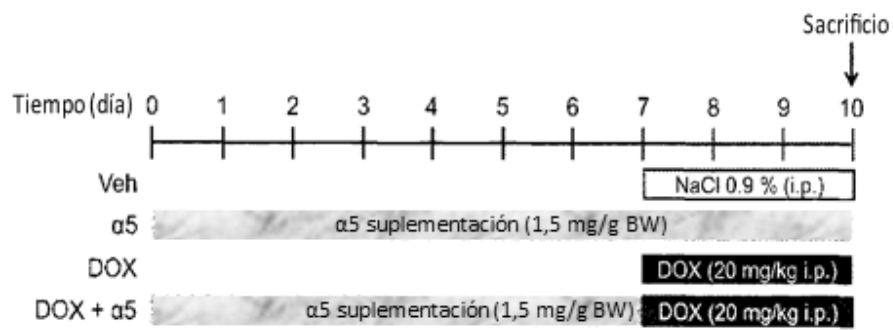


Figura 2

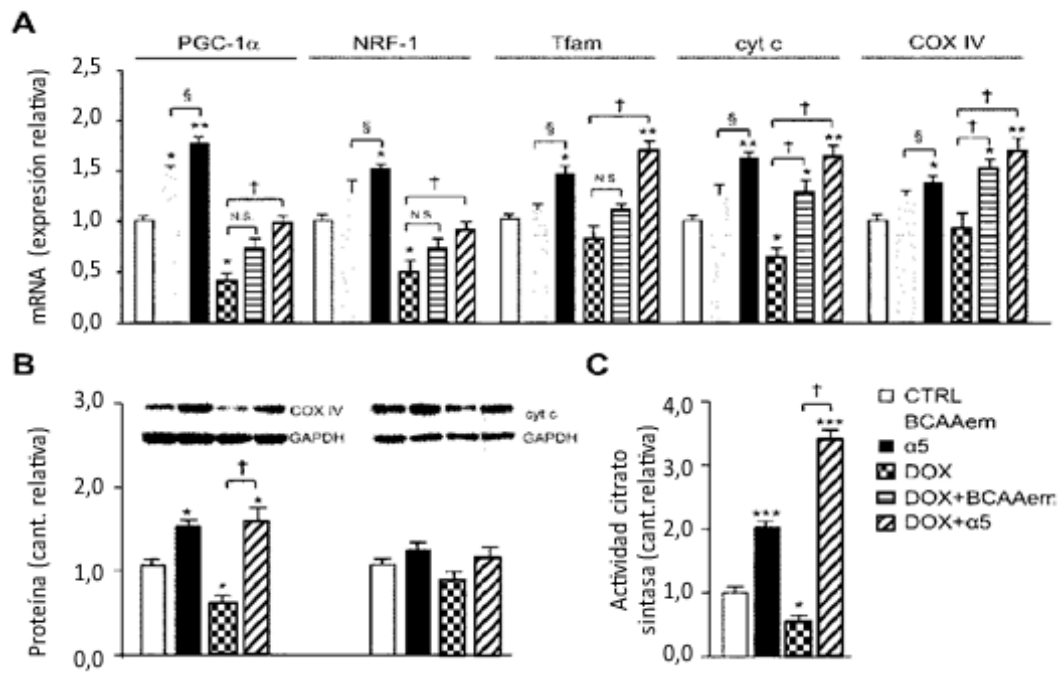


Figura 3

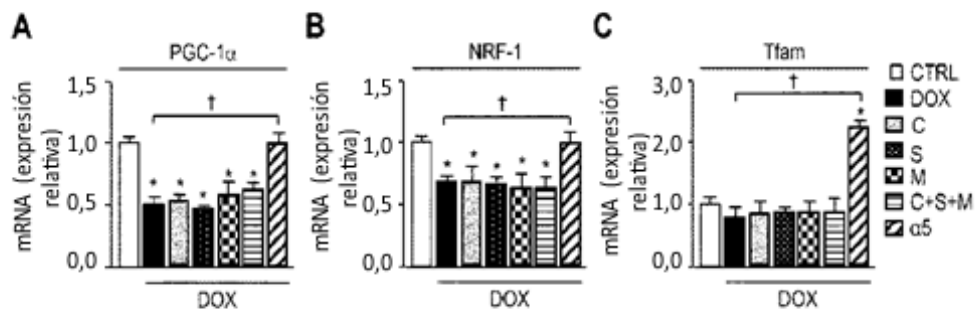


Figura 4

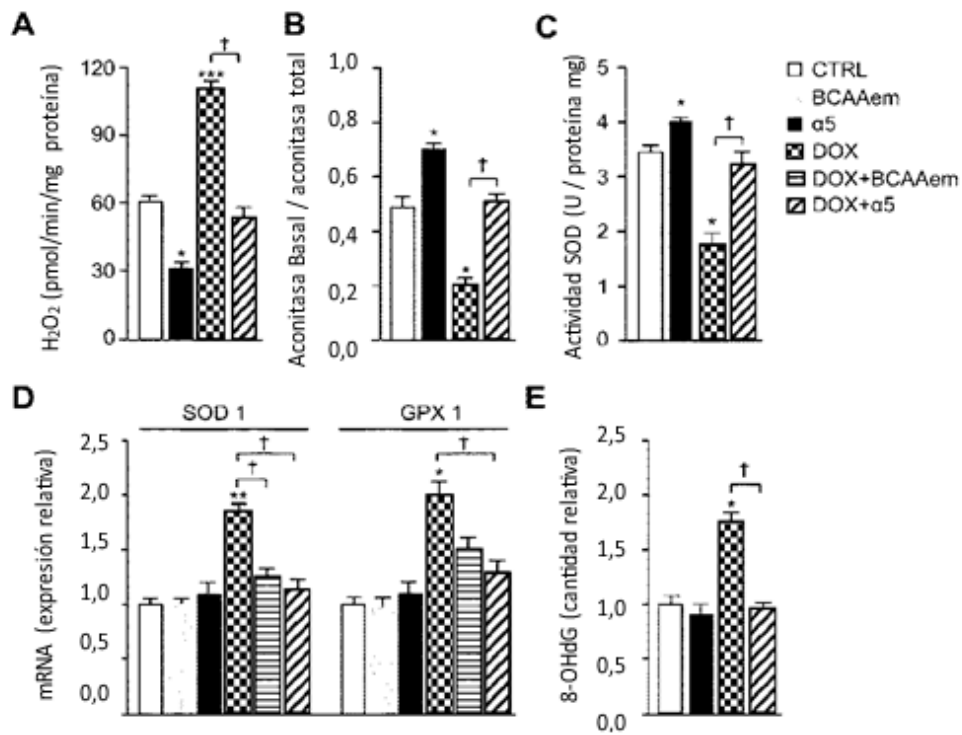


Figura 5

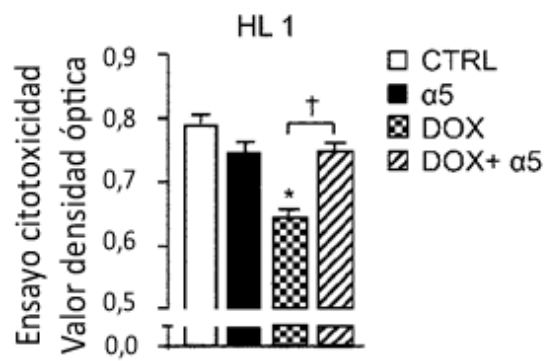


Figura 6

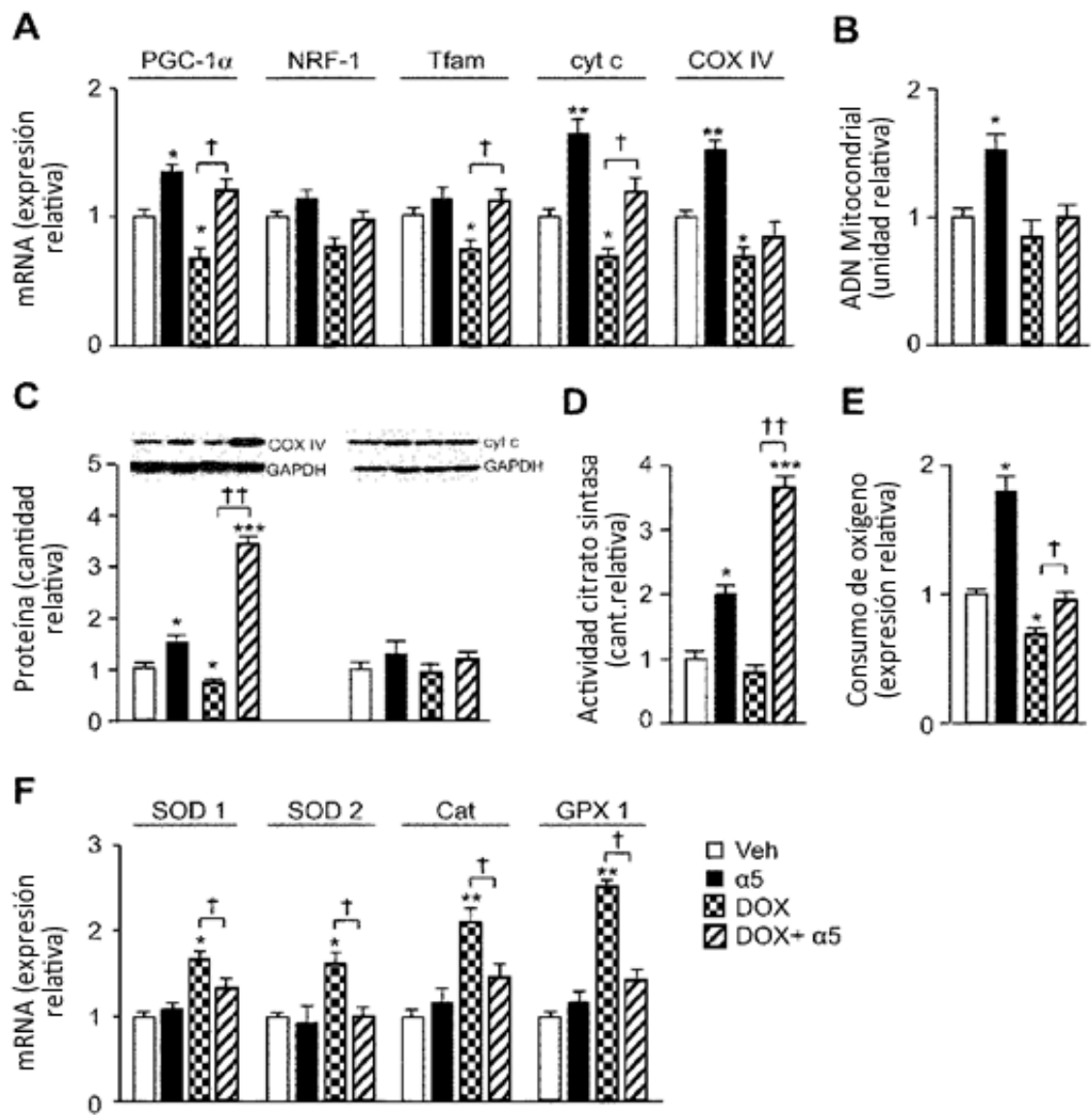


Figura 7

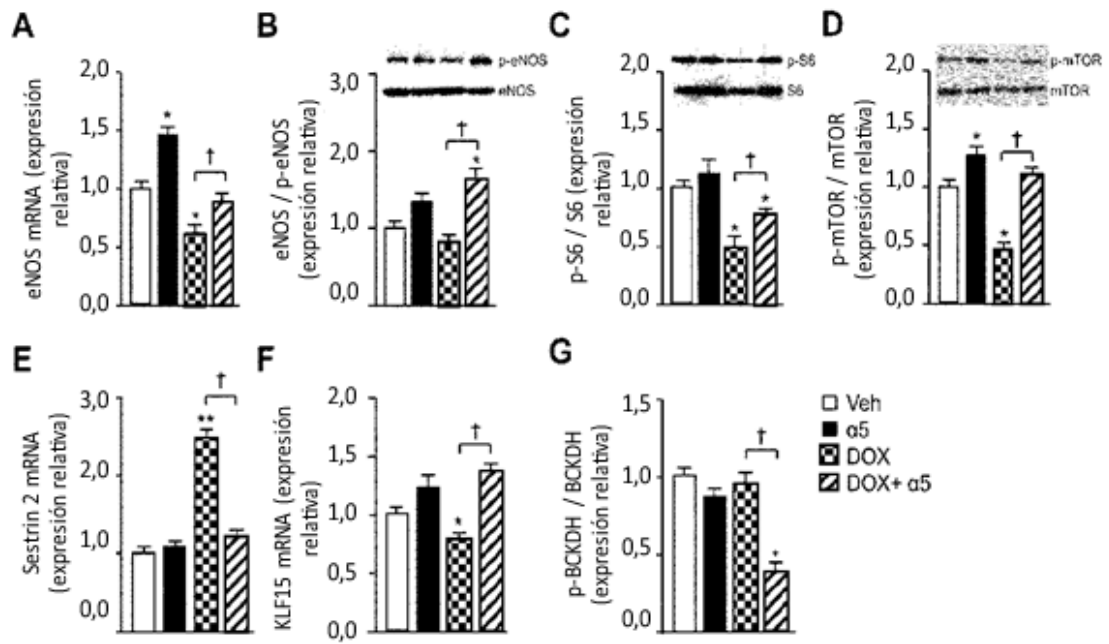


Figura 8

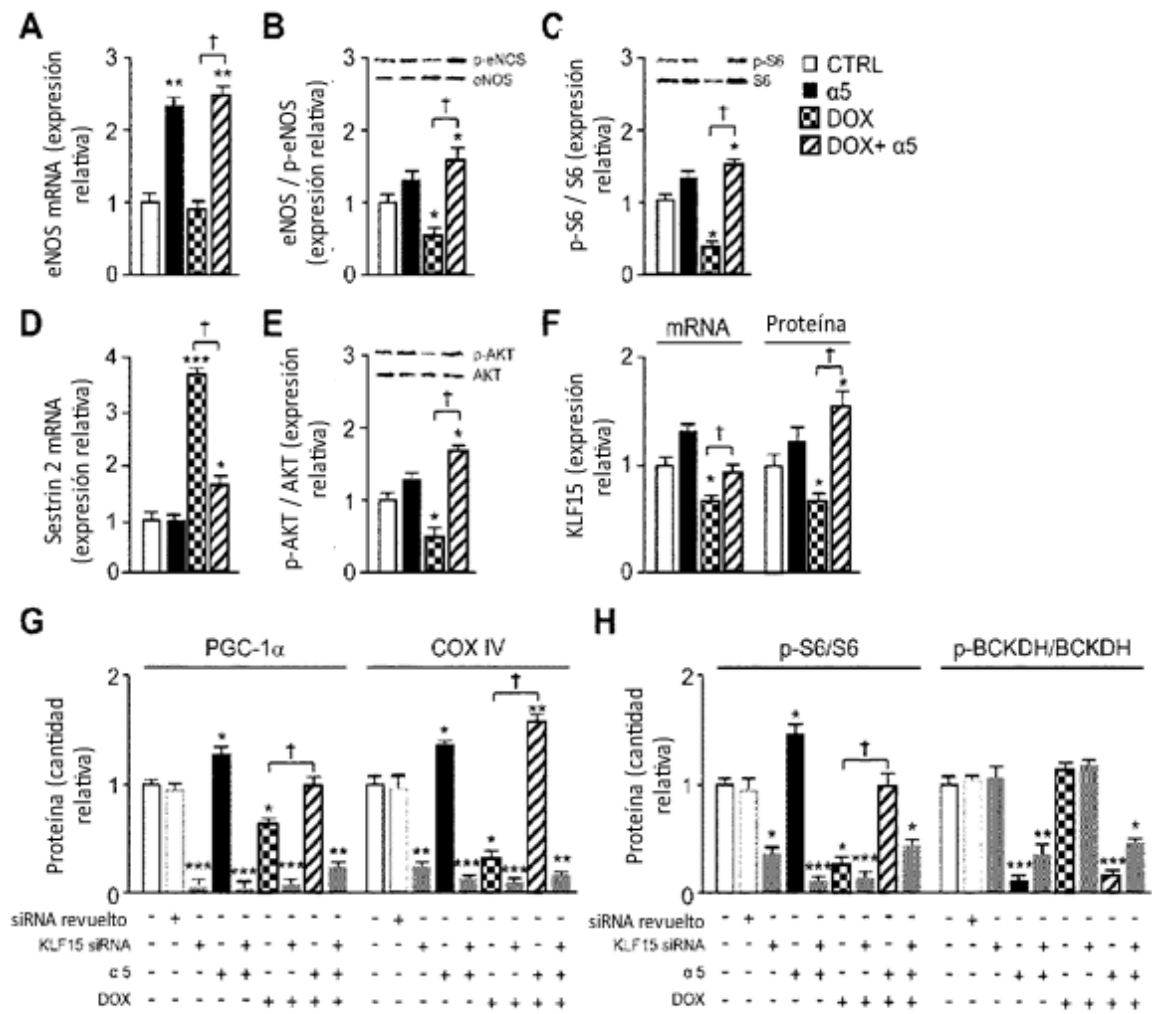


Figura 9

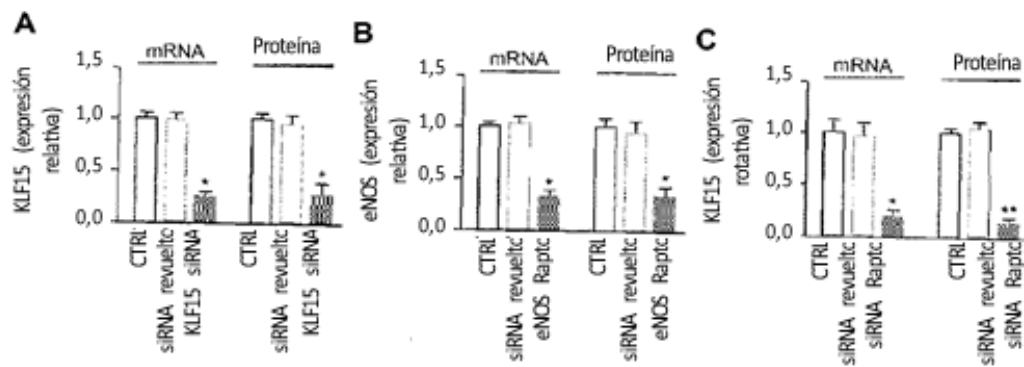


Figura 10

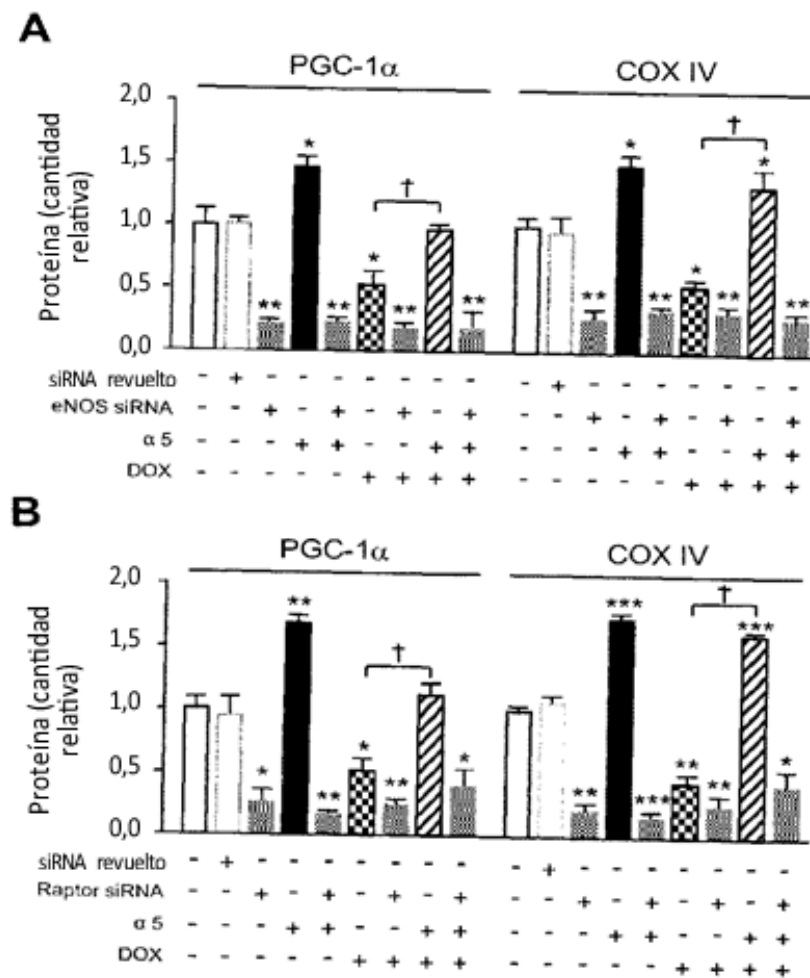


Figura 11

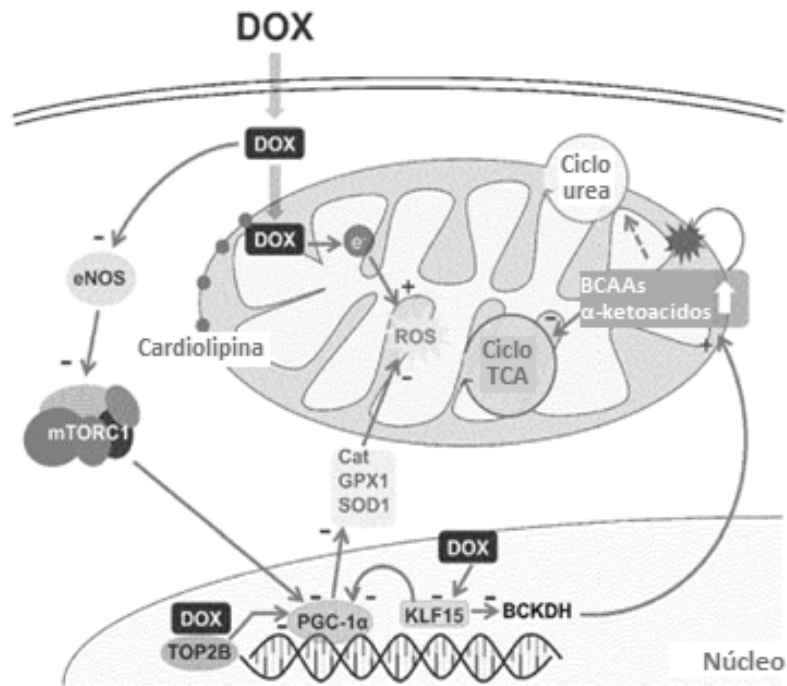


Figura 12

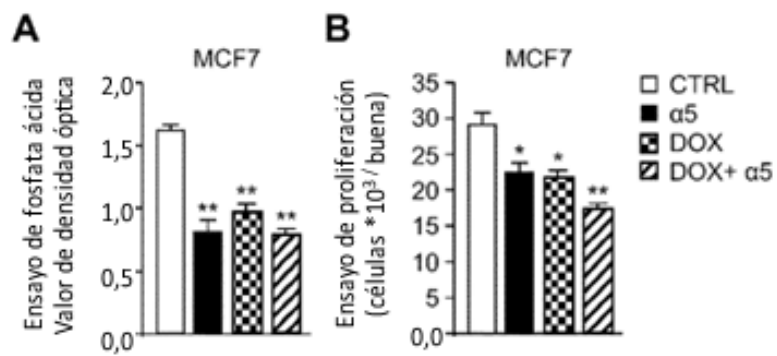


Figura 13